

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Kinderkardiologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Brockmeier

# **Einfrieren und Auftauen von humanen pluripotenten Stammzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Mario Serafimovski  
aus Würselen

promoviert am 20. Oktober 2025



Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Professor Dr. rer. medic. K. Pfannkuche  
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. F. Nguemo

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten. Bei der Auswertung des Materials habe ich eine statistische Beratung durch das Institut für Medizinische Statistik und Bioinformatik (IMSB) erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sowie deren Auswertung sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn PD Dr. Pfannkuche, Frau Tasneem Halhouli, Frau Lisa Münchhaffen, Herrn Dr. Sarkawt Hamad und durch den medizinisch-technischen Assistenten Herrn Daniel Derichsweiler von mir selbst ausgeführt und analysiert worden. Lediglich das Einfrieren und Auftauen der humanen pluripotenten Stammzellen nach dem gynäkologischen Protokoll wurde von Herrn Dr. Volodimir Isachenko durchgeführt.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 01.05.2025

Unterschrift: .....

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen von tiefstem Herzen meinen Dank aussprechen, die mich bei dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Allen voran ist Herr Professor Dr. rer. medic. Pfannkuche zu nennen, der es mir ermöglichte in die Welt der Kinderkardiologie und Stammzellforschung einzutauchen. Für die enorme Unterstützung, die wertvollen Tipps und die unendliche Geduld trotz zahlreicher E-Mails während der Doktorarbeit bedanke ich mich von ganzem Herzen.

Ebenso gilt Herrn Prof. Dr. Brockmeier mein großer Dank für die Ermöglichung dieses Projekts. Sie sind ein Vorbild, nicht nur für mich, sondern für all die Kinder, denen Sie als Arzt Hoffnung geben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Isachenko für die großartige Kooperation und exzellente Arbeit im Labor bedanken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern aus dem Labor des Zentrums für Physiologie und Pathophysiologie der Uniklinik Köln bedanken, die sich aufrichtig Mühe bei der Begleitung dieses Projekts gegeben haben. Insbesondere spreche ich Tasneem Halhouli, Lisa Münchhalfen und Dr. Sarkawt Hamad meinen Dank aus.

Zuletzt möchte ich meinen Dank an meine Familie, meine Freunde und die Menschen aussprechen, die mir im Leben besonders nahestehen. Der Dank, der euch gebührt, lässt sich nicht in Worte fassen. Ich schätze euch bis in die Ewigkeit und darüber hinaus.

Insbesondere meiner engsten Familie, vor allem meinen Eltern und meinem Bruder, danke ich für die unermessliche Unterstützung. Ohne eure harte Arbeit, euren selbstlosen Rückhalt und eure Liebe hätte ich das Privileg, zu studieren, nie wahrnehmen können und das alles nicht geschafft. Demnach ist das auch euer Erfolg und eure Leistung.

Außerdem möchte ich meinen Liebsten für die wundervollen Zusprüche und motivierenden Ermutigungen vom Tiefsten meines Herzens danken. Für all die stillen Gesten und das geduldige Dasein gilt mein herzlicher Dank. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

Ich danke euch allen für all die schönen Momente, die wir gemeinsam hatten und die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Auch in schweren Zeiten konntet ihr mich immer auffangen und mir zeigen, was es heißt, ein guter Mensch zu sein.

Gewidmet meinen Liebsten. Danke.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
2.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen	13
2.1.1. Medizinische Bedeutsamkeit kardiovaskulärer Erkrankungen	13
2.1.2. Therapiemöglichkeiten	14
2.2. Stammzellen	15
2.2.1. Anwendung der Stammzellen in der heutigen Forschung	15
2.2.2. Aufbau der Zelle	18
2.3. Die Kryokonservierung	21
2.3.1. Bedeutsamkeit der Kryokonservierung	21
2.3.2. Ablauf der Kryokonservierung	22
2.3.3. Gefrierschäden	25
2.3.4. Gefrierschutzadditive	30
2.3.4.1 Penetrierende Gefrierschutzadditive	31
2.3.4.2 Nicht penetrierende Gefrierschutzadditive	32
2.3.5. Langsame Kühlraten	33
2.3.6. Verglasung	33
2.3.7. Stand der Technik bei der Kryokonservierung von humanen Stammzellen	34
2.3.8. Problematik bei der Kryokonservierung komplexerer Systeme	36
2.4. Kryokonservierung in der Gynäkologie	38
2.4.1. Stand der Technik bei der Kryokonservierung von humanen Oozyten und humanen ovariellen Geweben	38
2.4.2. Ablauf der Kryokonservierung bei humanen ovariellen Geweben	40
2.4.3. Unterschiede zwischen den Methoden zur Kryokonservierung von humanen ovariellen Geweben und hiPSCs	41
2.5. Fragestellungen und Ziel der Doktorarbeit- Das <i>optimale</i> Protokoll	46
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>49</b>
3.1. Material	49
3.1.1. Equipment	49
3.1.2. Verbrauchsmaterial	50
3.1.3. Zelllinien	51
3.1.4. Chemikalien und Reagenzien	52
3.1.5. Puffer, Lösungen und Medium	54
3.2. Methoden	54
3.2.1. Zusammenfassung der methodischen Herangehensweise	54
3.2.2. Humane induzierte-pluripotente Stammzellen Kultur und Subkultivierung	58

3.2.3.	Generierung von Einzelzellen aus einem Monolayer	59
3.2.4.	Bestimmung der Zellviabilität	61
3.2.5.	Einfrieren der Einzelzellen nach etabliertem Protokoll	62
3.2.6.	Einfrieren der dreidimensionalen Aggregate nach etabliertem Protokoll	63
3.2.7.	Auftauprozess von Einzelzellen	63
3.2.8.	Auftauprozess von dreidimensionalen Aggregaten mittels Filterung	64
3.2.9.	Auftauprozess von dreidimensionalen Aggregaten mittels Trypsin	64
3.2.10.	Einfrierprozess der Stammzellen nach neuem Protokoll	65
3.2.11.	Auftauprozess nach neuem Protokoll	67
3.2.12.	Auftauprozess bei 100°C	68
3.2.13.	Messungen 24h nach Auftauen	69
3.2.14.	Einfrieren und Auftauen von undifferenzierten <i>embryoid bodies</i>	69
3.2.15.	Versuchsauswertung und Statistik	70
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>78</b>
4.1.	Basis Überlebensrate	78
4.2.	Absolute Überlebensrate	80
4.3.	Transporteffekt	84
4.4.	Relative Überlebensrate	85
4.5.	Wiederfindungsrate	88
4.6.	Adaptierte Überlebensrate	92
4.7.	Korrigierte Überlebensrate und $T_{eff}$	95
4.8.	Proliferationsrate	97
4.9.	Durchmesser	100
4.9.1.	Durchmesserbestimmungen der Einzelzellen und dreidimensionalen Aggregate	100
4.9.1.1	Durchmesserbestimmungen der Gruppen A2 und A1	101
4.9.1.1.1	Durchmesserbestimmungen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0	102
4.9.1.1.2	Durchmesserbestimmungen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1	103
4.9.1.1.3	Durchmesserbestimmungen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T2	104
4.9.1.1.4	Durchmesserbestimmungen der Gruppe A1 zum Zeitpunkt T1	105
4.9.1.2	Durchmesserbestimmungen der Gruppe Trypsinkontrolle	106
4.9.1.2.1	Durchmesserbestimmungen der Gruppe Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T1	106
4.9.1.2.2	Durchmesserbestimmungen der Gruppe Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T2	107
4.9.1.3	Durchmesserbestimmungen der Gruppe B1 und D1	107
4.9.1.3.1	Durchmesserbestimmungen der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T1	108
4.9.1.3.2	Durchmesserbestimmungen der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T2	109
4.9.1.3.3	Durchmesserbestimmungen der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T1	110
4.9.1.3.4	Durchmesserbestimmungen der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T2	112

4.9.2.	Durchmesserbestimmung der Sphäroide	113
4.9.2.1	Überprüfung der Voraussetzungen	113
4.9.2.2	Ergebnisse der Durchmesserbestimmung der Sphäroide	116
4.10.	Morphologie der Zellen	118
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>123</b>
5.1.	Allgemeiner Effekt der Kryokonservierung	123
5.2.	Vergleich zweier Kryomedien	126
5.3.	Auftauen der dreidimensionalen Aggregate mit Trypsin vs. mit einem Zellstrainer	131
5.4.	Kryokonservierung von Einzelzellen vs. dreidimensionalen Aggregaten	135
5.5.	Kryokonservierung von Einzelzellen nach dem etablierten Protokoll vs. nach dem gynäkologischen Protokoll	137
5.6.	Kryokonservierung von dreidimensionalen Aggregaten nach dem etablierten Protokoll vs. nach dem gynäkologischen Protokoll	144
5.7.	Auftauen der Zellen bei 37°C vs. bei 100°C	147
5.8.	Kryokonservierung von Sphäroiden ( <i>embryoid bodies</i> )	151
5.9.	Limitationen	154
5.10.	Ausblick	163
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>166</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>177</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	177
7.2.	Tabellenverzeichnis	178
<b>8.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>179</b>



## Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ACS	Akutes Koronarsyndrom
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
CDCs	Kardiosphärische Zellen (Cardiosphere-derived cells)
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMs	Kardiomyozyten
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
c-Myc	Cellular Myelocytomatosis Oncogene
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
E8	Essential 8
EBiSC	Europäische Bank für induziert-pluripotente Stammzellen
EBs	Embryonale Körperchen (Embryoid bodies)
ESC	Embryonale Stammzelle
FBS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
hESC	Humane embryonale Stammzelle
hiPSCs	Humane induziert-pluripotente Stammzellen
hPSCs	Humane pluripotente Stammzellen
HSF1	Hitzeschockfaktor 1
iPSCs	Induziert-pluripotente Stammzellen
KHK	Koronare Herzkrankheit
Klf4	Kruppel-like Faktor 4
L	Liter

M	Molar
MEF	Embryonaler Mäusefibroblast (mouse embryo fibroblast)
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt
NYHA	New York Heart Association
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PEG-200	Polyethylenglykol-200
PMEF	Primäre embryonale Mäusefibroblasten
PNIPAAm	Poly-N-Isopropylacrylamid
PSC-CM	Pluripotente Stammzellen-Kardiomyozyten
P/S	Penicillin und Streptomycin
ROCK Inhibitor	Rho-assoziierte Proteinkinase Inhibitor
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RYR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SD	Standardabweichung
SERCA2A	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums 2A
SMA	Spinale Muskelatrophie
Sox2	Sex determining region Y-Box Transkriptionsfaktor 2
SSEA-4	Stage-specific embryonic antigen 4
SSS	Serum Substitute Supplement

STEMI	ST-Hebungs-Myokardinfarkt
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TICAP	Transkoronäre Infusion von kardialen Progenitorzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRA-1-60 / -1-81	T-Zell Rezeptor alpha Locus 1-60 /1-81
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Z-VAD-FMK	Carbobenzoxymethyl-valyl-alanyl-aspartyl-O-methyl-fluoromethylketon
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius

## 1. Zusammenfassung

Aufgrund der Pluripotenz sowie der Fähigkeit der ständigen Zellerneuerung nehmen humane-induziert pluripotente Stammzellen (hiPSCs) einen hohen Stellenwert in der regenerativen Medizin ein. Eine klinische Translation der stammzellbasierten Therapie erfordert die Etablierung eines effizienten und vor allem skalierbaren Kryokonservierungsprotokolls. Eingeschränkt wird die optimale Kryokonservierung durch niedrige Überlebensraten, die induzierte Differenzierung sowie das Einfrieren geringer Zellmengen. Ursächlich hierfür sind Gefrierschäden, deren Pathomechanismen bis heute nicht ganz verstanden wurden.

In dieser Arbeit wurden mehrere Parameter und Zwischenschritte der Kryokonservierung miteinander verglichen, um so das bereits etablierte Protokoll zur Kryokonservierung von hiPSCs in einer Einzelzellsuspension zu optimieren. Damit dies gelingt, wurden zwei Einfriermedien, zwei Auftautemperaturen und das Einfrieren von Einzelzellsuspensionen versus 3D-Aggregate miteinander verglichen.

Da die Kryokonservierung komplexerer, dreidimensionaler Systeme in der Reproduktionsmedizin bisher größere Erfolge verzeichnet, wurde das Protokoll zur Kryokonservierung von ovariellm Gewebe auf hiPSCs angewandt. Damit eine skalierbare Methode näher untersucht werden konnte, wurden Zellsphäroide (*embryoid bodies*) aus hiPSCs generiert, um so Ausgangsmaterial für die Beladung von Bioreaktoren zu produzieren. So wurden vor dem Einfrieren, unmittelbar nach und 24h nach dem Auftauen die Überlebensraten, die Proliferations- und Wiederfindungsrate, die lichtmikroskopische Morphologie und der Durchmesser der Zellen miteinander verglichen und analysiert. Da eine Dissoziation der Zellen im Rahmen der Kryokonservierung notwendig war, wurden auch die enzymatische und mechanische Dissoziation miteinander verglichen. Des Weiteren wurde der Transport der hiPSCs in das gynäkologische Labor als Faktor berücksichtigt.

Ziel dieser Arbeit war es, auf Basis der oben genannten Parameter das bestehende Protokoll zur Kryokonservierung der hiPSCs zu optimieren, indem die Überlebensrate erhöht und Zellen im Sinne eines skalierbaren Verfahrens als dreidimensionales Aggregat sowie als Zellsphäroide kryokonserviert werden.

Die Resultate zeigten in der Beobachtung, dass die hiPSCs von einer Reduktion der DMSO Konzentration durch Kombination mehrerer penetrierender und nicht-penetrierender Gefrierschutzmittel profitierten. Außerdem ließ sich beobachten, dass Einzelzellsuspensionen besser als dreidimensionale Aggregate den Kryokonservierungsprozess überlebten. Ferner präsentierte sich die Tendenz, dass die nach dem gynäkologischen Protokoll kryokonservierten hiPSCs-Einzelzellsuspensionen niedrigere, absolute Überlebensraten aufwiesen als jene, die nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden. So lässt sich

vermuten, dass die Einzelzellen nicht vom Verfahren aus der gynäkologischen Reproduktionsmedizin profitierten, ohne dass dieses weiter auf Stammzellen angepasst wird. Besonders bei Einzelzellsuspensionen konnte beobachtet werden, dass die Kombination aus dem etablierten Protokoll und dem gynäkologischen Einfriermedium zu einer effizienten Kryokonservierung mit absoluten Überlebensraten von rund 60% geeignet schien. Zwar war der Vergleich der beiden Protokolle bei der Kryokonservierung von hiPSCs-Aggregaten komplexer, da generell niedrige, absolute Überlebensraten und verschiedene Dissoziationsmethoden als Faktoren hinzukamen, jedoch konnte auch hier die Tendenz beobachtet werden, dass sich das etablierte Protokoll für hiPSCs-Aggregate eignete. Erwähnt werden sollte jedoch die generell niedrige absolute Überlebensrate der kryokonservierten 3D-Aggregate. Beim Vergleich der beiden Methoden zur Dissoziation von hiPSCs-Klumpen konnte observiert werden, dass die absolute Überlebensrate nach der Kryokonservierung durch enzymatische Dissoziation mit Trypsin besonders niedrig war, sodass die mechanische Dissoziation nach der Kryokonservierung präferiert wurde. Bei den Gruppen, die nach dem Auftauen mit Trypsin inkubiert wurden, ist davon auszugehen, dass ein Teil der Zellen durch die Trypsinierung und nicht durch den eigentlichen Kryokonservierungsprozess untergingen. Dahingegen zeigte sich die Tendenz, dass die hiPSCs vermutlich nicht von einer Auftautemperatur bei 100°C profitierten. Die Kryokonservierung der Zellsphäroide konnte illustrieren, dass auch bei der Kryokonservierung von *embryoid bodies* das Protokoll der weiteren Optimierung bedarf.

Zusammenfassend konnten durch paarweise Vergleiche mehrerer Gruppen Tendenzen identifiziert werden, die einen weiteren Einblick in das komplexe Zusammenspiel der dynamischen Prozesse während der Kryokonservierung erlaubten. Erfreulicherweise konnte eine Verbesserung der absoluten Überlebensraten durch eine Modifizierung des Einfriermediums beobachtet werden, jedoch konnte das Protokoll aus der Reproduktionsmedizin nicht direkt auf die Kryokonservierung von hiPSCs übertragen werden. Es zeigte sich, dass Erkenntnisse aus der reproduktionsmedizinischen Kryobiologie sich teilweise nicht auf die Kryobiologie von Stammzellen übertragen ließen.

Nichtsdestotrotz stellt diese Doktorarbeit einen Ausgangspunkt für weitere Forschungsprojekte dar, die sich vor allem mit der Kryokonservierung komplexerer Systeme sowie deren Skalierbarkeit im Bereich der Stammzellforschung und Reproduktionsmedizin beschäftigen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

#### 2.1.1. Medizinische Bedeutsamkeit kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen seit Jahrzehnten die führende Todesursache in Deutschland dar und können mit einer massiven Einschränkung der Lebensqualität einhergehen.<sup>1</sup> Es wird geschätzt, dass insgesamt 17,5 Millionen Menschen pro Jahr weltweit an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung sterben. Somit sind ca. 31% aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen.<sup>2</sup>

In Europa sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache. Dabei ist nicht nur die ältere, sondern auch die jüngere Bevölkerung betroffen. Durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehen bei Patienten unter 70 Jahren in Europa jährlich ca. 60 Millionen potenzielle Lebensjahre verloren.<sup>3</sup>

Kardiovaskuläre Erkrankungen umfassen ein breites Spektrum an Krankheitsbildern. Zur wichtigsten Form gehört die koronare Herzerkrankung (KHK). Diese ist als Manifestation einer Atherosklerose der Herzkranzgefäße definiert. Grob lässt sich die KHK in zwei verschiedene Gruppen einteilen. Dazu gehören die asymptomatische KHK, auch stumme Ischämie genannt, sowie die symptomatische KHK. Mit einem Anteil von 14% an allen Todesursachen stellt die KHK eine der wichtigsten Volkskrankheiten dar, weshalb es einer näheren Betrachtung dieses Krankheitsbildes bedarf. Die symptomatische KHK lässt sich in die stabile Angina pectoris, die ischämische Herzmuskelschädigung, das akute Koronarsyndrom, Herzrhythmusstörungen und den plötzlichen Herztod einteilen. Da das akute Koronarsyndrom (ACS) ein lebensbedrohliches Krankheitsbild darstellt, sollten die drei Manifestationsformen des ACS differenziert werden. Dazu gehören die instabile Angina pectoris, der ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI) sowie der Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI).<sup>4</sup>

Dabei bilden die Risikofaktoren der KHK gleichzeitig die Gründe dafür, warum dieses Krankheitsbild als Volkskrankheit gilt. Ein hoher BMI, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus sowie eine Dyslipidämie machen einen hohen Anteil an der attributablen Krankheitslast aus. Diese Risikofaktoren tragen demnach signifikant zum Krankheitsbeginn von kardiovaskulären Erkrankungen sowie deren Progredienz bei.<sup>1</sup>

Die Modifikationen dieser Risikofaktoren werden auch in den Leitlinien der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen berücksichtigt.<sup>5</sup> Trotz zahlreicher Bemühungen durch Etablierung von präventiven Maßnahmen sowie der Optimierung einer Therapie, steigt die Prävalenz-Ratio der Herzinsuffizienz-Patienten bspw. bei allen männlichen Altersgruppen in Deutschland zwischen 2007 und 2019.<sup>6</sup> Mit einer Lebenszeitprävalenz von 9,3% bei den 40-79-Jährigen stellt die KHK eine signifikante Volkskrankheit dar.<sup>4</sup>

Dies bedingt massive wirtschaftliche Folgen. Während 2015 die Krankheitskosten für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland bei ca. 338 Milliarden Euro lagen, wuchs die Summe im Jahre 2020 auf ca. 432 Milliarden Euro.<sup>7</sup> Damit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die höchste ökonomische Belastung für das deutsche Gesundheitssystem dar.<sup>8</sup>

Die medizinischen Folgen einer KHK können vielfältig sein. Dazu gehören unter anderem der Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen sowie der plötzliche Herztod.<sup>9,10</sup> Mit einer Mortalität von 30-50% außerhalb des Krankenhauses und einer Mortalität von 4-6% im Rahmen der stationären Behandlung, gilt der Myokardinfarkt weiterhin als bedrohliches und ernst zu nehmendes Krankheitsbild.<sup>11</sup> Zwar verbessern sich stetig die therapeutischen Möglichkeiten, jedoch resultiert das Überleben eines akuten Myokardinfarkts oft in dem Krankheitsbild einer Herzinsuffizienz. Unter der Herzinsuffizienz versteht man eine Abnormalität kardialer Strukturen, die ein Ungleichgewicht zwischen Angebot und Nachfrage von Sauerstoff zur Folge hat.<sup>12</sup>

Insgesamt geht man von einem progredienten Anstieg bei der Inzidenz der Herzinsuffizienz aus. Ursachen dafür sind vor allem der demografische Wandel sowie eine stetige Verbesserung der Therapie von bspw. Kardiomyopathien oder Herzklappenerkrankungen.<sup>13,14</sup> Derzeit wird die Herzinsuffizienz als häufigster Grund für einen stationären Aufenthalt bei Patienten über 60 Jahren angegeben.<sup>15</sup> Doch auch die Betroffenheit pädiatrischer Patienten spiegelt sich in der Betrachtung der Epidemiologie wider. So liegt die Anzahl an Hospitalisierungen aufgrund von Herzinsuffizienz in den USA bei 11.000-14.000 pädiatrischen Patienten pro Jahr, wobei die Mortalität 7% beträgt.<sup>16</sup>

### **2.1.2. Therapiemöglichkeiten**

Die primären Ziele der Behandlung streben eine Senkung der Mortalität und Progression des Krankheitsverlaufs sowie eine Symptomlinderung und eine Verringerung der Frequenz der Krankenhauseinweisungen an.<sup>14</sup>

Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz ist vielfältig und verfolgt mehrere Ansätze. Zunächst sollte ein kausaler Therapieansatz verfolgt werden, indem beispielsweise Arrhythmien, Vitien oder die KHK therapiert werden. Bereits seit mehreren Jahrzehnten herrscht ein allgemeiner Konsens über die nicht-medikamentöse Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Durch Modifikationen des Lebensstils, zum Beispiel Nikotinabstinenz oder regelmäßige körperliche Bewegung, sowie durch patientenorientierte und krankheitsspezifische Schulungen soll ein ganzheitliches Therapiekonzept entwickelt werden. Die nicht-medikamentöse Therapie erzielt nicht nur positive Effekte auf das kardiovaskuläre System, sondern auch auf das muskulo-skelettale System, das neurohormonelle System und die Insulinsensibilität.<sup>17</sup>

Nichtsdestotrotz ist eine medikamentöse Therapie für viele Patienten unabdingbar. Die Therapie der Herzinsuffizienz orientiert sich an den NYHA-Stadien. Bei Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion stellt die Einnahme von ACE-Hemmern den derzeitigen medikamentösen Standard dar. Ersetzt werden kann die Wirkstoffgruppe durch Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitoren. Ergänzt werden kann die medikamentöse Therapie unter anderem durch Betablocker, Mineralkortikoid-Rezeptorantagonisten sowie durch SGLT2-Inhibitoren, Ivabradin und Digitalis.<sup>18</sup>

Trotz zahlreicher medikamentöser Optionen kann oftmals die Progredienz der Erkrankung nicht aufgehalten werden. Demnach gilt die Herztransplantation als weiterhin unabdingbare Therapiemöglichkeit und ist die Ultima Ratio bei der Behandlung von schweren kardiovaskulären Erkrankungen, wie zum Beispiel der Herzinsuffizienz.<sup>19</sup> Dieser Therapiezeitweig ist jedoch mit weiteren Problemen behaftet. So erreichte die Warteliste der Herztransplantationen im Jahre 2008 mit 800 Patienten einen neuen Höchststand.<sup>20</sup>

Insgesamt 528 Patienten wurden im Jahr 2020 auf die Warteliste zur Herztransplantation aufgenommen, wohingegen in Deutschland lediglich 339 Herztransplantationen durchgeführt wurden. Zu dieser Statistik kommen noch Patienten hinzu, die bereits vor 2020 auf die Warteliste aufgenommen wurden. Insgesamt 14.000 Patienten befinden sich auf der Warteliste von Eurotransplant.<sup>21</sup>

Dabei sollte vor Augen geführt werden, dass 12 Jahre nach einer Herztransplantation lediglich 50% der Patienten noch leben.<sup>22</sup> Daraus resultiert, dass ein Großteil der sich auf der Warteliste befindenden Patienten auf eine langfristige Behandlung mit Herzunterstützungssystemen als überbrückende Therapie angewiesen ist.<sup>20</sup> Dazu gehören beispielsweise linksventrikuläre Hilfssysteme, welche als Herzunterstützungssystem die Pumpleistung des Herzens verbessern sollen. Ein Beispiel dafür ist der *Heart Mate 3*, der bereits zu verminderten Raten an Schlaganfällen und Pump-Thrombosen geführt hat. Nichtsdestotrotz besteht weiterhin ein Risiko für unerwünschte Ereignisse, zum Beispiel gastrointestinale Blutungen und Infektionen.<sup>23,24</sup>

Das Minderangebot an Spenderorganen, Einschränkungen bei der Überlebensdauer von Transplantierten sowie nicht zu vernachlässigende Risiken von Herzunterstützungssystemen stellen eine medizinische Herausforderung dar, die eine dauerhafte Lösung erfordert.

## **2.2. Stammzellen**

### **2.2.1. Anwendung der Stammzellen in der heutigen Forschung**

Ein signifikantes Problem stellt die geringe regenerative Fähigkeit des Myokards *in vivo* dar.<sup>25</sup> Die erstmalige Entwicklung von humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) eröffnete ein



neues Kapitel in der biomedizinischen Forschung. Gewonnen werden hESCs von der inneren Zellmasse der Embryos im Stadium der Blastozyste, wofür Embryonen der *in vitro* Fertilisation prinzipiell zur Verfügung stehen.<sup>26</sup> Humane embryonale Stammzellen wachsen in dichten Kolonien, haben eine hohe Telomerase-Aktivität und verfügen über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Aufgrund ihrer Pluripotenz ist es den hESCs möglich, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Morphologische Kennzeichen sind eine zugunsten des Zellkerns verschobenes Zellkern-Zytoplasma-Verhältnis sowie prominente Nukleoli. *In vitro* ist es den hESCs möglich in Suspension sogenannte *embryoid bodies* (EBs) zu bilden. Dabei handelt es sich um dreidimensionale Zellaggregate, die spontan Differenzierungsschritte des früheren Embryos rekapitulieren.<sup>27</sup>

Ein weiterer Durchbruch in der Stammzellforschung war die Generierung induziert-pluripotenter Stammzellen. Dabei wurden somatische Zellen durch die Expression von Oct3/4, c-Myc, Sox2 und Klf4 reprogrammiert. Bei den somatischen Zellen handelte es sich zunächst um murine, embryonale oder adulte Fibroblasten und später um humane, adulte Fibroblasten.<sup>28,29</sup>

Die hiPSCs weisen mit den hESCs morphologische Gemeinsamkeiten auf und haben ebenfalls die Fähigkeit der Pluripotenz sowie der Selbsterneuerung. Überdies weisen hiPSCs ähnliche Oberflächenmarker wie hESCs auf.<sup>27</sup>

Die Arbeit mit Stammzellen bietet einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in verschiedensten medizinischen Bereichen. Dies liegt darin begründet, dass Stammzellen zur unbegrenzten Teilung fähig sind und sich aufgrund ihrer Pluripotenz in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können.<sup>30</sup>

So spielen hiPSCs eine wichtige Rolle in der *in vitro* Modellierung von Krankheiten.<sup>31</sup> Durch die Verwendung von Stammzellen konnten beispielsweise Rückschlüsse auf die Pathogenese der spinalen Muskelatrophie (SMA) geschlossen werden.<sup>32</sup> Durch iPSCs-basierte Modelle konnten zudem Pathomechanismen und potenzielle, neue Medikamente des Morbus Parkinson erfasst werden.<sup>33</sup> Auch im Bereich der Kardiologie konnte die Stammzellforschung weitere Erkenntnisse hervorbringen. Die Arbeit mit SARS-CoV-2 infizierten hiPSCs brachte neue Erkenntnisse zu Genen hervor, die an der Genese der COVID-19 Myokarditis beteiligt sind und demnach als Biomarker in der Diagnostik genutzt werden können.<sup>34</sup> Mit dem CRISPR/Cas9 *Genom Editing* konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Titin Gen eine verminderte Kontraktilität der hiPSC-CMs bewirkten.<sup>35</sup>

Außerdem wurden „*Organ-on-a-chip models*“ etabliert, bei denen hiPSCs auf neuartige Trägerflächen platziert wurden. Durch Kombination dieser Modelle mit Biosensoren wurde versucht, die Komplexität physiologischer Prozesse *in vivo* auf ein *in vitro* Modell zu übertragen.<sup>36</sup>

Weitere Anwendungsgebiete der Stammzellen sind die Pharmakologie sowie die prädiktive Toxikologie. Durch hiPSCs konnten erstmals die Auswirkungen genetischer und epigenetischer Variabilitäten auf die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik bestimmter Medikamente getestet werden. Beispielsweise ist es durch hiPSC-CMs möglich, Vorhersagen zu potenziell kardiotoxischen Effekten einer Krebstherapie zu machen.<sup>37</sup>

Doch die Fähigkeiten der Stammzellen macht man sich nicht nur in diesen beiden Bereichen der Medizin zu Nutze: Ein wichtiges Feld, in dem die hiPSCs benutzt werden, ist die regenerative Medizin. Bereits 2014 wurde der erste Patient aufgrund seiner makulären Degeneration mit retinalen Pigmentepithelzellen therapiert, die aus human induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) kultiviert worden waren.<sup>38</sup>

Eine neuere Modifikation einer solchen Therapie beinhaltet beispielsweise die Betrachtung des humanen Leukozytenantigens. Unter Berücksichtigung einer solchen Kompatibilität erhielten fünf Patienten, die eine Atrophie des retinalen Pigmentepithels aufwiesen, im Rahmen einer klinischen Studie homologe hiPSC-RPEs sowie einen VEGF-Inhibitor. Durch das Therapieregime überlebten die Stammzell-abgeleiteten retinalen Zellen die Verlaufskontrolle von einem Jahr und es konnte auf eine systemische Immunsuppression verzichtet werden.<sup>39</sup>

Außerdem verzeichnet die regenerative Medizin im kardiologischen Bereich große Fortschritte. In einer Studie, in der im Mäusemodell eine Ischämie der Hinterbeine induziert wurde, kam man zu dem Ergebnis, dass eine wiederholte intravenöse Therapie mit hiPSC-MSCs die Blutperfusion der Hinterbeine verbessern konnte.<sup>40</sup> Insbesondere die Kombination aus Stammzellforschung und künstlichen Intelligenzen findet bereits erste Anwendung. Durch das Heranziehen von künstlichen Intelligenzen kann eine umfassende Datenanalyse durchgeführt werden, sodass neue Erkenntnisse für die kardiologische Forschung gezogen werden können.<sup>41</sup>

Bei der Therapie des Myokardinfarkts sowie der Herzinsuffizienz mittels Stammzellen gibt es zwei verschiedene Ansätze, zwischen denen man prinzipiell unterscheidet: Bei dem ersten Verfahren handelt es sich um eine Injektion kardialer Vorläuferzellen ins Myokard. Dies kann die Ejektionsfraktion erhöhen, jedoch sind das Überleben sowie die Anheftung der Zellen im Myokard derzeit noch nicht zufriedenstellend.<sup>42</sup>

Sogar im Bereich der Kinderkardiologie wurden erste Erfolge verzeichnet. So kann beispielsweise die TICAP Studie aufgeführt werden. Im Rahmen dieser klinischen Studie konnte eine signifikante Verbesserung der rechtsventrikulären Funktion bei jenen Kindern mit hypoplastischem Linksherzsyndrom festgestellt werden, die eine intrakoronare Injektion mit autologen CDCs vier bis fünf Wochen nach kardiochirurgischer Operation erhielten. Außerdem konnte bei allen Kindern eine Verbesserung des Herzinsuffizienz-Status festgestellt werden.<sup>43</sup>

Bei der zweiten Therapie bedient man sich des Prinzips des kardialen *Tissue Engineering*. Dabei wird ganzes Gewebe *in vitro* gezüchtet, um so beispielsweise dysfunktionales Gewebe *in vivo* zu ersetzen.<sup>44</sup> Die klinisch potenziellen Applikationen unterscheiden sich dabei. Es werden derzeit unter anderem Patches mit mesenchymalen Stammzellen entwickelt, die in einer offenen Herzoperation dem Patienten aufgenäht werden sollen.<sup>45</sup> Im Tiermodell konnten bereits Erfolge verzeichnet werden. Bei der Transplantation von human-skalierten, kardialen Patches auf Herzen von Meerschweinchen konnte die linksventrikuläre Funktion verbessert werden.<sup>46</sup>

Auch in Deutschland finden Patches Verwendung. So wurden skalierbare Patches aus Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten entwickelt, welche epikardial immunsupprimierten Ratten transplantiert wurden. Nach dem Eingriff zeigte sich, dass die Patches vaskularisiert und erfolgreich integriert wurden. Das generierte kardiale Gewebe eignete sich nicht nur für eine skalierbare Implantation, sondern auch für die Modellierung der Herzinsuffizienz in Laboratorien.<sup>47</sup>

Ein weniger invasives Verfahren umfasst ein Spray, bei dem Biomaterial benutzt wird, welches nach Applikation *in situ* polymerisiert. Für dieses Verfahren sind weder Kleber noch Nahtstiche notwendig.<sup>48</sup>

Das Feld der kardialen Stammzelltherapie umfasst insgesamt viele verschiedene Verfahren, wobei sich die meisten noch in der präklinischen Phase der Optimierung befinden. Waren niedrige Differenzierungsraten der hiPSCs in der Vergangenheit ein essenzielles Hindernis, so können bereits seit einigen Jahren differenzierte kardiale Vorläuferzellen in hoher Quantität mit einer hohen Reinheit generiert werden.<sup>49</sup> Neben bereits beschriebenen Problemen wie einem geringen Anheften des Biomaterials an das Herz oder einer geringen Zellüberlebensrate nach dem Einsetzen der Zellen, stellt auch die Generierung eines skalierbaren Protokolls zur Kryokonservierung von hiPSCs die Stammzellforschung vor ein großes Problem. Um die Komplexität dieser Problematik und die Gründe dahinter genau verstehen zu können, bedarf es weiterer Erklärungen.

### **2.2.2.      Aufbau der Zelle**

Die Zelle ist die kleinste funktionelle und lebensfähige Einheit aller Lebewesen. Der menschliche Körper besteht aus ca.  $3,72 \times 10^{13}$  Zellen.<sup>50</sup> Aufgrund ihrer Pluripotenz können sich Stammzellen in mehr als 200 verschiedene Zelltypen differenzieren.<sup>51</sup> Wichtige Faktoren, die zur Aufrechterhaltung der Zelle beitragen, sind die Membranintegrität und das Milieu, in dem sich die Zelle befindet. Dabei wird die Membranintegrität oft als Indikator der Zellviabilität gewertet. Dies liegt in mehreren Faktoren begründet. Zum einen kann nur durch eine intakte

semipermeable Membran ein adäquater osmotischer Konzentrationsgradient aufgebaut werden. Außerdem spielt die Membran bei der Signaltransduktion und der Zelladhäsion eine wichtige Rolle und erlaubt damit den Aufbau der interzellulären Kommunikation. Des Weiteren kann bei intakter Membranintegrität das Zytoplasma als abgeschlossener Reaktionsraum für wichtige metabolische Prozesse genutzt werden.<sup>52</sup>

Um den Einfluss der Plasmamembran auf die Funktionalität der Zelle verstehen zu können, muss zunächst der Aufbau der Membran verstanden werden. Im Elektronenmikroskop ist der Aufbau der Plasmamembran deutlich erkennbar. Die Plasmamembran besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht. Diese bildet eine Barriere zwischen zwei wässrigen Schichten. Somit sind die hydrophilen Kopfteile der amphiphilen Phospholipide nach außen gerichtet und die hydrophoben, fettsäurehaltigen Schwänze nach innen. Die vier wichtigsten Phospholipide sind Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin. Sie nehmen mehr als die Hälfte der in der Membran vorkommenden Lipide ein. Zu erwähnen ist ebenfalls Phosphatidylinositol, das lediglich an der inneren Hälfte der Plasmamembran vorkommt und eine signifikante Rolle bei der Signaltransduktion spielt. Weitere fetthaltige Komponenten der Membran sind Glykolipide und Cholesterol. Überdies besteht die Membran aus wichtigen Proteinen, die 50% des Gewichts der Membran ausmachen. Grob werden diese in periphere und integrale Proteine eingeteilt und sie tragen zur osmotischen Homöostase sowie zur zellulären Kommunikation bei. Die Glykokalyx, die aus transmembranösen Glykoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden besteht, spielt für die Zelladhäsion, die Zell-Zell-Interaktion und den generellen Schutz der Zelle eine wichtige Rolle. Folglich beteiligt sich der komplexe Aufbau der Plasmamembran am Überleben der Zelle.<sup>53</sup>

Die Phospholipid-Doppelschicht wird in Abbildung 1 skizziert:

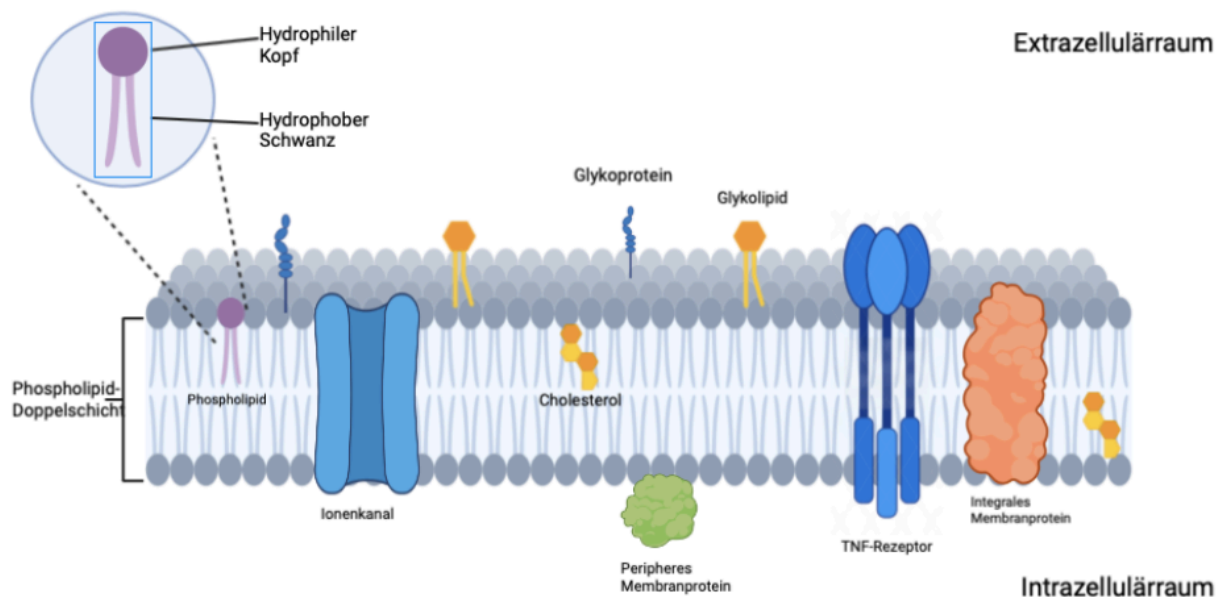


Abbildung 1: Übersichtsdarstellung des Aufbaus der Plasmamembran

Die Abbildung wurde nach Cooper (2000)<sup>53</sup> verändert und mit Biorender.com erstellt. Abgebildet wird die Phospholipid-Doppelschicht, deren Aufbau sich durch den amphiphilen Charakter der Phospholipide erklären lässt. In der Membran sind Ionenkanäle, integrale Membranproteine sowie beispielsweise TNF-Rezeptoren eingelagert, welche beim Prozess der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus stellen periphere Membranproteine, Glykoproteine, Glykolipide und Cholesterol essenzielle Bestandteile der Zellmembran dar.

Bei Disruption der Membran kann das Zellüberleben nicht mehr gewährleistet werden. Grund hierfür ist eine Dyshomöostase, die in einem osmotischen und oxidativen Stress sowie in der Toxizität von Calcium begründet ist.<sup>54,55</sup> So sind bereits Krankheitsbilder bekannt, bei denen eine fragile Plasmamembran sowie reduzierte Reparaturmechanismen identifiziert wurden. Dazu gehören beispielsweise die Duchenne Muskeldystrophie oder die Niemann-Pick-Krankheit.<sup>52</sup>

Doch auch die Herzzellen sind auf eine intakte Membranintegrität angewiesen.<sup>56</sup> Es konnte gezeigt werden, dass ein mechanisch bedingter, transientscher Membranschaden bei murinen Kardiomyozyten auch im gesunden Herzen ein fundamentales Ereignis darstellt. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Reparatur der Plasmamembran *in vivo* kontinuierlich stattfindet. Um den Membranschaden zu quantifizieren, wurde das zytoplasmatische Serumalbumin bestimmt, welches als Marker für Wundereignisse gilt. Außerdem wurde unter anderem die

Freisetzung von FGF gemessen, da eine vermehrte Freisetzung von FGF als potenzieller Pathomechanismus der mechanisch-induzierten Hypertrophie des Herzens bei Herzinsuffizienz betrachtet wird. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation der murinen Kardiomyozyten konnte eine Verdreifachung der Zellschädigungsfrequenz verzeichnet werden. Aufgrund der Tatsache, dass der linke Ventrikel des Herzens höherem Druck ausgesetzt ist, ist dieser im Laufe des Lebens anfälliger für Hypertrophien.<sup>57</sup>

Damit einhergehend ist eine erhöhte Rate an Reparaturmechanismen der Plasmamembran. Da die Hypertrophie des Herzens neben der Fibrosierung eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz einnimmt, spielt folglich die Membranintegrität der Kardiomyozyten bei der Herzinsuffizienz eine nicht zu vernachlässigende Rolle.<sup>56,58</sup>

Dass die Membranintegrität eine derart essenzielle Rolle im Zellüberleben einnimmt, zeigt sich nicht nur bei der Betrachtung von diversen Krankheitsbildern, sondern auch bei der Kryokonservierung.

## **2.3. Die Kryokonservierung**

### **2.3.1. Bedeutsamkeit der Kryokonservierung**

Eine unabdingbare Voraussetzung für die Arbeit im kardialen *Tissue Engineering* ist die Etablierung effektiver und effizienter Protokolle nicht nur für die Zellkultur, sondern auch für die Lagerung der Zellen unter hohen qualitativen und quantitativen Standards. Zur Lagerung bedient man sich der Kryokonservierung. Die Kryokonservierung ist ein Prozess, bei dem Zellen, Gewebe oder Organe bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt gelagert werden, um so die Viabilität der Zellen aufrechtzuerhalten. Durch eine Erniedrigung der Temperatur kann folglich die Aktivität von biochemischen Prozessen einer Zelle drastisch gesenkt werden, mit dem Ziel, die Molekularstruktur der eingefrorenen Probe aufrechtzuerhalten.<sup>59</sup> Daraus ergibt sich eine fast unbegrenzte Lagerdauer.<sup>60</sup>

Seit der Entdeckung 1949, bei der während der Kryokonservierung von Spermatozoen der protektive Effekt von Glycerin festgestellt wurde, gewinnen das Einfrieren und Auftauen von Zellen zunehmend an Bedeutung.<sup>61</sup>

Durch die Entdeckung der Kryokonservierung konnte der Alltag im Labor deutlich erleichtert werden. So kann durch das Einfrieren von Zellen mehr Platz in Laboratorien geschaffen werden. Überdies muss nicht permanent eine lebendige Zellkultur aufrechterhalten werden, was die Flexibilität im Laboralltag erhöht. Des Weiteren ermöglicht die Kryokonservierung eine potenziell leichtere Beobachtung der Zellen, da sich diese bei niedrigen Temperaturen nicht mehr bewegen.<sup>62</sup> Überdies kann das genetische Material von Spezies, die vom Aussterben bedroht sind, durch Kryokonservierung gesichert werden.<sup>63</sup> Ein weiteres Feld, in dem die

Kryokonservierung alltäglich angewandt wird, ist die *in vitro* Fertilisation in der Reproduktionsmedizin.<sup>64</sup>

Damit bestehende Kryokonservierungsprotokolle verbessert werden können, sollten die biochemischen Prozesse während der Kryokonservierung verstanden werden.

### **2.3.2. Ablauf der Kryokonservierung**

Die wesentlichen Schritte der Kryokonservierung für eine Zellsuspension lassen sich vereinfacht wie folgt darstellen:

- 1) Kultivierung und anschließende Aberntung der Zellen
- 2) Zugabe des Gefrierschutzadditivs zum Kulturmedium der Zellsuspension
- 3) Beginn der Kühlung sowie Induktion der Eiskristallisation
- 4) Lagerung der Zellen (meist in Flüssigstickstoff)
- 5) Schnelles Aufwärmen der Zellen im Wasserbad bei 37°C
- 6) Entfernen des Gefrierschutzadditivs
- 7) Erneute Kultivierung der Zellen

Bei den beschriebenen Schritten handelt es sich jedoch nur um eine Übersicht, da sich einige Kryokonservierungsprotokolle in den einzelnen Schritten voneinander unterscheiden.<sup>27</sup>

Bei der Kryokonservierung von Zellen differenziert man prinzipiell zwischen zwei verschiedenen Verfahren. Diese Verfahren lassen sich anhand der Kühlrate unterscheiden: Die langsame Kryokonservierung und die schnelle Kryokonservierung, auch Vitrifikation genannt. Unter langsamen Kühlraten versteht man üblicherweise jene zwischen 0,3-1°C pro Minute.<sup>65</sup>

Beiden gemein sind die allgemeinen Prozesse, die während der Kryokonservierung geschehen. Lediglich die Auftretenswahrscheinlichkeiten dieser Prozesse unterscheiden sich. Vor der Kryokonservierung befinden sich die Zellen im physiologischen Temperaturbereich zwischen 20°C (Raumtemperatur) und 37°C (Inkubator). In dieser Phase laufen die biochemischen Prozesse in der Zelle ohne Störung ab. Durch Abkühlen der Zelle auf Temperaturen zwischen +20 und -2°C laufen Prozesse der Signalweiterleitung langsamer ab. Diese Phase kann als Vorbereitung auf den Einfrierprozess verstanden werden.<sup>66</sup>

Bei Temperaturen zwischen -2°C und -15°C unterkühlt die Lösung.<sup>66</sup> Unter Unterkühlung versteht man in der Kryobiologie, dass eine Lösung nicht direkt bei Erreichen der Gleichgewichtserstarrungstemperatur kristallisiert, sondern ohne Bildung von Kristallen weiter abkühlt.<sup>67</sup> Durch fortschreitende Unterkühlung erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die extrazelluläre Eisbildung um den Nukleationskeim in diesem thermodynamisch instabilen Zustand.<sup>65-67</sup> Die Nukleation beschreibt die Bildung von Eiskristallen aus kristallinem Wasser, die im Rahmen der Abkühlung von wässrigen Lösungen entstehen.<sup>65</sup> Unter dem

Nukleationskeim versteht man in der Kryobiologie den Startpunkt der extrazellulären Eisbildung.<sup>66</sup> Da das System den thermodynamisch günstigeren Zustand erreicht, wird durch die Kristallisation von Wasser Latentwärme freigesetzt. Dies macht sich als kurze Temperaturerhöhung bemerkbar.<sup>67</sup>

Die Wahrscheinlichkeit der Eiskristallisation nimmt mit dem Volumen und mit der Temperaturabnahme zu. Aufgrund der Tatsache, dass sich in dem gebildeten Eis keine Stoffe lösen, induziert die Eiskristallisation eine Erhöhung der Osmolarität in der restlichen, flüssigen Phase des extrazellulären Raumes.<sup>65</sup> Da die Plasmamembran semipermeabel ist, folgt Wasser dem osmotischen Gradienten und erniedrigt so die Osmolarität im extrazellulären Raum, sodass sich der osmotische Gradient verkleinert. Der daraus resultierende Prozess der Dehydratation beschreibt das Schrumpfen der Zelle durch die Diffusion von Wasser.<sup>67</sup> Dies geschieht bis zum Eutektikum. Dadurch wird das Moment beschrieben, an dem ein System von der flüssigen in die feste Phase übergeht und komplett kristallisiert.<sup>65</sup>

Wird die Temperatur des Systems weiterhin erniedrigt – bei den meisten Systemen zwischen  $-15^{\circ}\text{C}$  und  $-25^{\circ}\text{C}$  – so verschwindet die flüssige Phase und es folgt eine Zunahme der Bildung von Eis und Salzkristallen. Meistens ist die Lösung jedoch übersättigt, sodass das Eiswachstum fortschreitet. Zum Schluss wird durch die hohe Konzentration das Erstarren der Lösung in Glas erreicht.<sup>65-67</sup>

Zwischen  $-25^{\circ}\text{C}$  und  $-130^{\circ}\text{C}$  findet der Prozess der Rekristallisation statt. Darunter versteht man das migratorische Wachstum von großen Eiskristallen auf Kosten kleinerer Kristalle. Im Rahmen dessen werden ganze Eisdomänen gebildet. Die Auftretenswahrscheinlichkeit der Rekristallisation nimmt mit fallenden Temperaturen ab. Bei Temperaturen unterhalb von  $-130^{\circ}\text{C}$  finden nahezu keine biochemischen Prozesse mehr statt, sodass eine Langzeitlagerung bei diesen Temperaturen als sicher betrachtet wird.<sup>66</sup>

Der grobe Ablauf der Kryokonservierung in diesem experimentellen Design wird in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt:



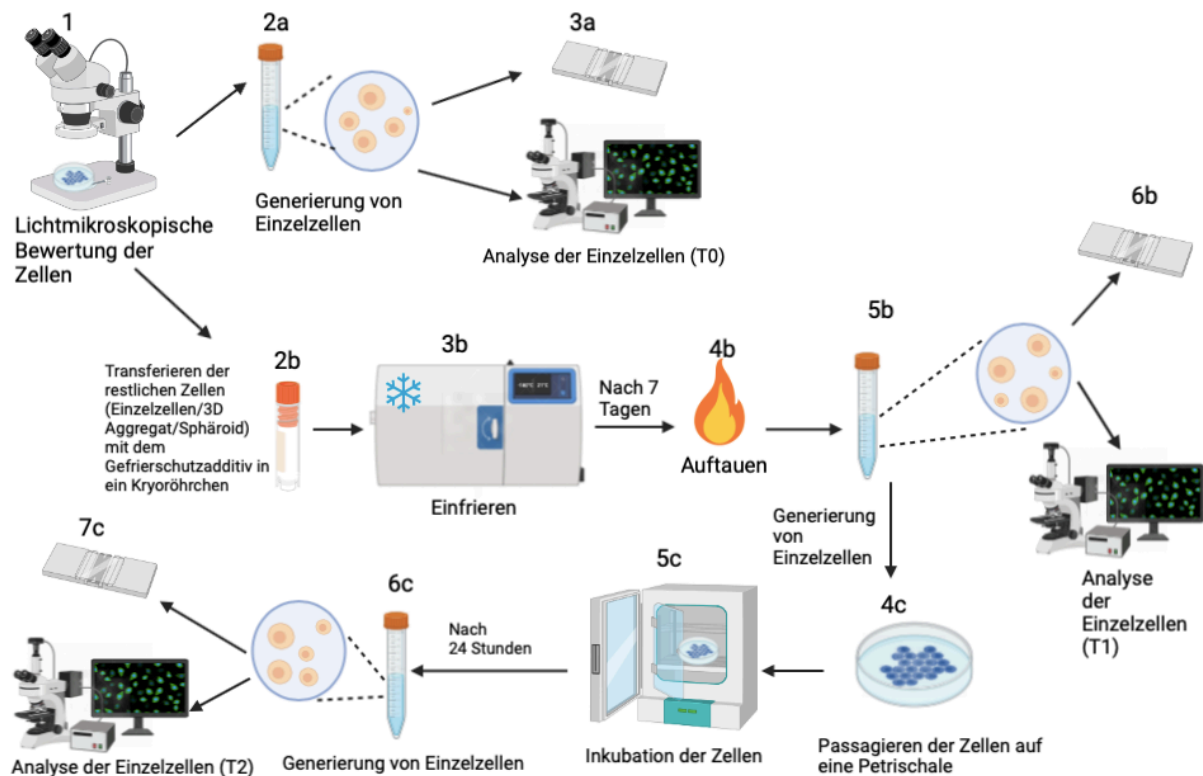


Abbildung 2: Grober Ablauf der Kryokonservierung in diesem Experiment-Design

Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

(1) Vor dem Einfrieren erfolgt eine lichtmikroskopische Evaluation der Zellen im Hinblick auf die Zellmorphologie sowie das Proliferationsverhalten.

(2a) Ein Teil der Zellen wird zur Generierung von Einzelzellen verwendet.

(3a) Die entstandenen Einzelzellen werden mit einer Neubauer-Zählkammer sowie mit einem Fluoreszenz-Mikroskop evaluiert, um so einen Ausgangswert zu bestimmen (T0).

(2b) Der Großteil der restlichen Zellen wird für die Kryokonservierung verwendet.

(3b) Die Kryokonservierung findet je nach Protokoll in einer automatisierten Einfriermaschine oder in einem Tiefkühler statt.

(4b) Nach sieben Tagen werden die kryokonservierten Zellen aufgetaut.

(5b) Ein Teil der Zellen wird erneut zur Generierung von Einzelzellen verwendet.

(6b) Um den direkten Effekt der Kryokonservierung zu bewerten, wird ein Teil der Zellen direkt nach der Kryokonservierung analysiert (T1).

(4c) Der Großteil der restlichen Zellen wird auf eine Zellkulturschale passagiert.

(5c) Die Zellen werden bei 37°C inkubiert.

(6c) Nach 24h werden Einzelzellen generiert.

(7c) Die entstandenen Einzelzellen werden analysiert, um so einen längerfristigen Effekt der Kryokonservierung zu bewerten.

### 2.3.3. Gefrierschäden

Wie bereits beschrieben hat die Durchführung der Kryokonservierung einen maßgeblichen Effekt auch auf das Zellüberleben und die Zelldifferenzierung. Zurückführen lässt sich dies auf jene Schädigungsmechanismen, die im Rahmen des Kryokonservierungsprozesses auftreten. Bereits 1970 postulierte Mazur im Rahmen seiner Arbeit an Hefezellen die Zwei-Faktor-Hypothese der Gefrierschäden, welche in Korrelation zur Kühlrate steht.<sup>68</sup>

Diese These bestätigte er durch seine weitere Arbeit an komplexeren, mesenchymalen Hamsterzellen. So wurden zwei maßgebliche Faktoren eruiert, die zur Entstehung von Gefrierschäden beitragen: Die osmotische Schädigung der Zellen sowie die Bildung von intrazellulären Eiskristallen. Aufgrund der Tatsache, dass bei der Erniedrigung der Temperatur zunächst das extrazelluläre Wasser kristallisiert, erhöht sich die Konzentration im Extrazellularraum. Die daraus resultierende Dehydratation kann so vor Terminierung der Zellaktivität geschehen. Überdies wird durch die Dehydratation die Stabilität der Plasmamembran reduziert, sodass diese anfälliger für Ruptur oder Aufspaltung wird.<sup>69</sup>

Dass eine intakte Membranintegrität für das Zellüberleben unabdingbar ist, wurde bereits beschrieben (siehe 2.2.2). Hinsichtlich der Dehydratation wird für Säugetierzellen eine Grenze von bis zu 50% des ursprünglichen Wassergehalts aufgeführt, ab deren Überschreiten es zur Irreversibilität der Zellschäden kommt.<sup>70,71</sup> Das Wasser, das in der Plasmamembran zwischen den Phospholipiden eingelagert ist und als Platzhalter dient, wird der Zelle beim Einfrieren entzogen. Dadurch lagern sich die Kohlenwasserstoffketten wegen der hydrophoben Wechselwirkungen zusammen, sodass die Membran ihre Flexibilität verliert, gelartig und somit fragiler wird.<sup>72,73</sup> Bei der größten Schwachstelle der Plasmamembran handelt es sich um die Kontaktzone zwischen Membranproteinen und Phospholipiden.<sup>74</sup>

Dabei wird gemäß der Zwei-Faktor-Hypothese angenommen, dass eine zu geringe Kühlrate die Auftretenswahrscheinlichkeit der Dehydrierung erhöht. Dies liegt darin begründet, dass bei einer zu geringen Kühlrate der osmotische Gradient für eine zu lange Zeit auf die Zelle einwirkt. So schrumpft die Zelle zu stark, die Membranintegrität wird gestört und die Salzkonzentration im Inneren der Zelle schädigt diese irreversibel.<sup>69</sup>

Der zweite Faktor, der bei der Hypothese aufgeführt wird, ist der mechanische Stress, der auf die Zellen durch die intrazelluläre Eiskristallbildung einwirkt. Zwar reduziert eine hohe Kühlrate die Auftretenswahrscheinlichkeit der Dehydratation, jedoch birgt die hohe Kühlrate ein anderes Risiko, welches sich negativ auf das Zellüberleben auswirkt. Wenn die Zellen bei zu hohen Kühlraten eingefroren werden, hat das Wasser innerhalb der Zelle nicht genug Zeit über die semipermeable Membran zu diffundieren. Die Folge ist, dass bei weiterer Erniedrigung der Temperatur die Kristallisation des intrazellulären Wassers initiiert wird. Die entstandenen Eiskristalle schädigen die Zellorganellen sowie die Membranintegrität.<sup>68</sup>

Dies liegt darin begründet, dass das entstandene Eis um 1/11 größer ist als das ursprüngliche Wasservolumen. Dabei korreliert die Eismenge pro Zelle mit dem Ausmaß des zellulären Schadens. Überdies wird der Workman-Reynold-Effekt als zusätzlicher Grund für Kryoschäden aufgeführt. Dieser beschreibt, dass die Ionenkonzentration an den Eisträndern erhöht ist. Dieser Konzentrationsgradient resultiert ebenfalls in zellulärem Stress.<sup>66</sup>

Es wird beschrieben, dass der Zelle durch die Formation von Eiskristallen Wasser entzogen wird, sodass nicht nur die Hydrathülle der Plasmamembran, sondern auch der intrazellulären Proteine geschädigt werden. Folglich wird die Proteinstruktur der Zellen geschädigt und es kommt zur Denaturierung.<sup>75</sup>

Die groben Schädigungsmechanismen bei der Kryokonservierung werden in Abbildung 3 visualisiert:

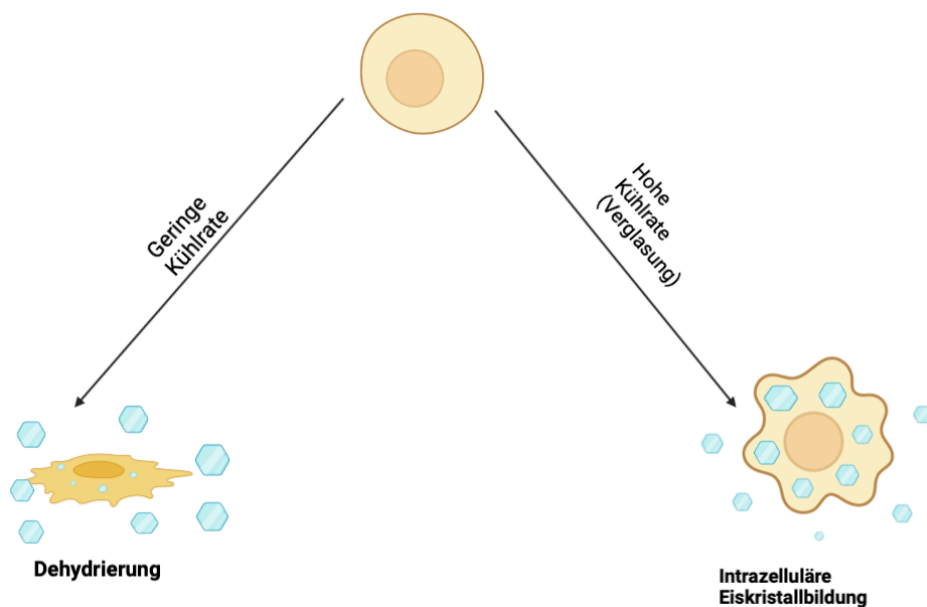


Abbildung 3: Kryoschäden einer Zelle durch die Kühlrate

Die Abbildung wurde nach Jang et al. (2017)<sup>59</sup> verändert und mit Biorender.com erstellt.

Dargestellt werden die zwei wichtigsten Schädigungsmechanismen der Zellschädigung im Rahmen der Kryokonservierung. Bei einer zu niedrigen Kühlrate kommt es zur Dehydrierung der Zelle im Sinne einer osmotischen Schädigung, wohingegen bei einer zu hohen Kühlrate die intrazelluläre Eiskristallbildung das Zellüberleben beeinträchtigt.

Die Zwei-Faktor-Hypothese fasst folglich diese beiden Prozesse der Gefrierschädigung zusammen. Dabei wird angenommen, dass für jede Zelle ein individuelles Optimum der Kühlrate besteht. Die optimale Kühlrate liegt in jenem Bereich, in welchem die beiden beschriebenen Effekte von Mazur am geringsten sind.<sup>69</sup>

Dies kann graphisch in Abbildung 4 folgendermaßen dargestellt werden:

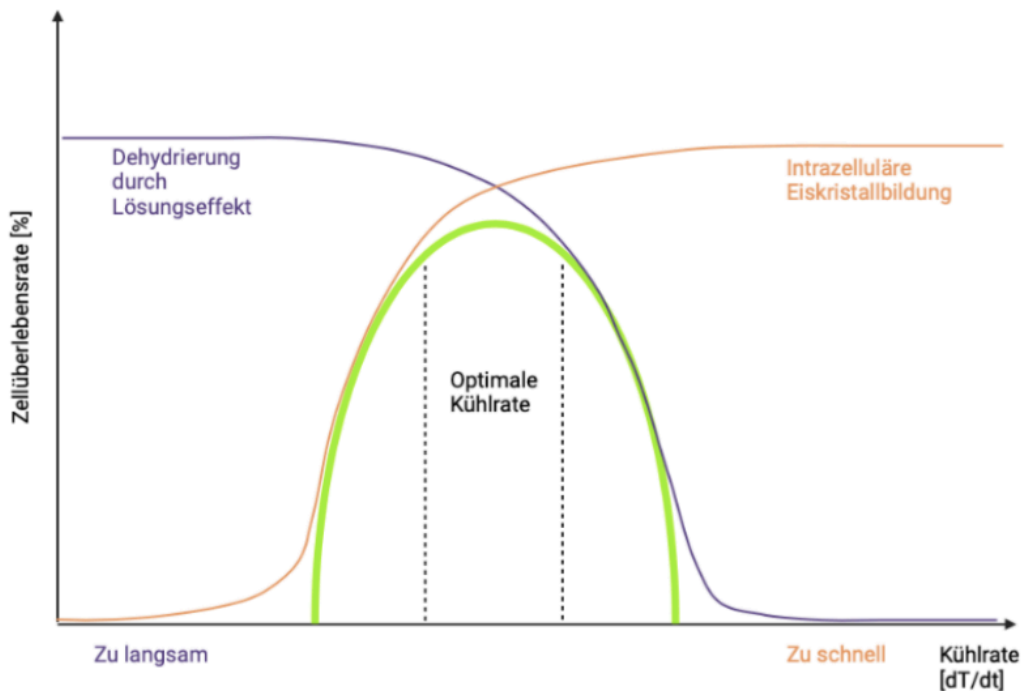


Abbildung 4: Mazurs Zwei Faktor Hypothese

Die Abbildung wurde aus Schulz (2011)<sup>65</sup> verändert und mit Biorender.com erstellt. Abgebildet wird die Abhängigkeit des Zellüberlebens von der Kühlrate. Aufgrund der zwei hauptsächlichen Schädigungsmechanismen ergibt sich ein Bereich der optimalen Kühlrate, in welchem die Effekte der Dehydrierung und der intrazellulären Eiskristallbildung minimal sind.

Nichtsdestotrotz berücksichtigt die Zwei-Faktor-Hypothese nicht alle Mechanismen der Kryoschädigung. So sollte erwähnt werden, dass die bereits beschriebene Bildung von Eisdomänen bei  $-25^{\circ}\text{C}$  bis  $-130^{\circ}\text{C}$  ebenfalls ein Grund für die Schädigung von Zellen während des Einfrierens sein kann.<sup>66</sup>

Überdies wird der Einfluss des Auftauens auf das Zellüberleben diskutiert. Wurde eine niedrige Auftaurate gewählt, überlebten weniger Zellen das Auftauen. Ein Grund dafür kann die erneute Rekristallisation sein. Beim Erhöhen der Temperatur kann ein erneutes migratorisches Wachstum kleinerer Kristalle zu größeren Kristallen geschehen, da diese Form energetisch günstiger ist. Dies kann zur Folge haben, dass sich der osmotische Gradient beim Auftauen erhöht und vermehrt Wasser in die Zelle einströmt. Die Zelle wird in der Folge lysiert, falls die Plasmamembran dem Druck nicht standhält. Folglich bedingt die Rekristallisation beim Auftauen sowohl einen mechanischen als auch einen osmotischen Schaden der Zelle.<sup>76</sup>

Ein weiterer kritischer Punkt, der einen Einfluss auf das Zellüberleben hat, ist der Prozess der Devitrifikation (Synonym: Entglasung). Beim Auftauen der Zellen kann festgestellt werden, dass das intrazelluläre glasartige Gemisch mit der Kristallisation beginnt. Diese intrazelluläre

Eisbildung schädigt die Zelle erneut.<sup>77</sup> Um diese genannten Effekte zu minimieren, wird ein möglichst schneller Auftauprozess als positiv betrachtet.<sup>78</sup>

Die Gefrierschäden bewirken nicht nur eine geringe Zellüberlebensrate, denn auch andere Effekte bei aufgetauten Zellen wurden beschrieben. So konnte nachgewiesen werden, dass Zellen nach einem Kryokonservierungszyklus eine veränderte Morphologie aufweisen. Demnach erscheinen lichtmikroskopisch die Zellgrenzen unregelmäßig und diffus.<sup>30</sup> Überdies konnten beispielsweise bei aufgetauten Spermatozoen eine laterale Kopfverschiebung und eine geringere Mitochondrienintensität detektiert werden.<sup>79</sup>

Außerdem konnte gezeigt werden, dass frisch aufgetaute Zellen eine niedrigere Proliferationsrate aufweisen als Zellen, die keinen Kryokonservierungszyklus durchliefen. Eine niedrige Anheftungsrate beim Ausplattieren der Zellen 24 Stunden nach dem Auftauen konnte ebenfalls bei den kryokonservierten Zellen festgestellt werden. Des Weiteren konnten bei Stammzellen in der Durchflusszytometrie nach der Kryokonservierung verminderte Pluripotenz-Marker detektiert werden. Diese beinhalten den nukleären Marker Oct-4 sowie Oberflächenmarker wie TRA-1-60, TRA-1-81 und SSEA-4. Die Analyse des Transkriptoms hat einen besonders hohen Stellenwert in der Identifizierung von induzierten biochemischen Prozessen nach einem Kryokonservierungszyklus. Transkriptomanalysen zeigten vor allem Deregulationen in Genen, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wichtig sind. So konnte eine vermehrte Expression von fast allen Genen festgestellt werden, die an der Regulation der embryonalen Morphogenese, der Gewebe-Morphogenese, der vaskulären Entwicklung und Regenerierung sowie der Ossifikation beteiligt sind.<sup>30</sup>

Die Auswirkungen der Kryokonservierung äußern sich auch in der praktischen Anwendung. Demnach sollten die Auswirkungen eines Kryokonservierungszyklus bei der Anwendung von aufgetauten Zellen bedacht werden. So zeigten kryokonservierte hiPSCs-Kardiomyozyten eine reduzierte Kontraktilität, eine Überexpression von Zellzyklus-Genen sowie Veränderungen des Kalzium-Stoffwechsels. Dies resultierte in einer veränderten Antwort der kryokonservierten Kardiomyozyten bei der präklinischen Testung von Wirkstoffen.<sup>80</sup>

Eine Vielzahl von Faktoren kann so das Zellüberleben im Rahmen der Kryokonservierung beeinflussen. Eine grobe Übersicht der Schritte der Kryokonservierung sowie entsprechende kritische Variablen fasst die Tabelle 1 zusammen:

<b>Schritte der Kryokonservierung</b>	<b>Kritische Variable</b>
Zellkultivierung	<ul style="list-style-type: none"><li>- Überlebensrate der Zellen</li><li>- Zelldichte und Proliferation</li><li>- Differenzierungsgrad der Zelle</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kontamination</li> <li>- Kulturmedium</li> </ul>
Gefrierschutzadditiv	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expositionsdauer auf die Zellen bei Raumtemperatur</li> <li>- Temperatur der Zellen bei Zugabe des Gefrierschutzmittels</li> <li>- Technik der Hinzugabe des Gefrierschutzadditivs</li> <li>- Wahl des Gefrierschutzmittels</li> <li>- Kombination von Gefrierschutzadditiven</li> <li>- Konzentration des Gefrierschutzmittels</li> </ul>
Abkühlung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zelldichte im Kryoröhrchen</li> <li>- Kühlrate</li> <li>- Dehydrierung</li> <li>- Bildung intrazellulärer Kristalle</li> <li>- Gebrauch von automatisierten Einfriermaschinen</li> <li>- <i>Seeding</i>-Zwischenschritt</li> </ul>
Aufbewahrung der Zellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Langzeitlagerung versus kurzfristige Lagerung</li> <li>- Kontaminationsgefahr durch direkten Kontakt der Zellen mit Flüssigstickstoff</li> </ul>
Auftauen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wahl der Auftautemperatur sowie der Geschwindigkeit des Auftauens</li> <li>- Expositionsdauer des Gefrierschutzadditivs auf den Zellen bei Raumtemperatur</li> <li>- Rekristallisation</li> <li>- Osmotischer Schock der Zellen</li> <li>- Technik der Hinzugabe des Kulturmediums</li> <li>- Zentrifugation</li> </ul>
Zellkultivierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zusammensetzung des Kulturmediums</li> <li>- Zelldichte</li> <li>- Häufigkeit des Medienwechsels</li> <li>- Einsatz von Molekülen zur Verbesserung des Zellüberlebens</li> </ul>

*Tabelle 1: Übersicht der Schritte einer Kryokonservierung sowie entsprechende kritische Variablen*

*Die Tabelle wurde nach Martin-Ibanez et al. (2012)<sup>27</sup> verändert.*

Es wird deutlich, dass die Optimierung der Kryokonservierung einen vielschichtigen Prozess darstellt und von einer Vielzahl von Variablen beeinflusst wird. Demnach ist es logisch, dass Zellen sich je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad aufgrund ihres verschiedenen Aufbaus in ihrer Reaktion auf die Kryokonservierung sehr unterschiedlich verhalten.

Zusätzlich lässt sich erwähnen, dass bisher nicht alle Pathomechanismen der Gefrierschäden verstanden wurden.<sup>81</sup>

Aufgrund dieser Komplexität lässt sich erklären, warum der Bereich der Kryokonservierung noch einen hohen Bedarf an Forschungsarbeit sowie Optimierungsprozessen hat. Dies kann jedoch als Chance für zukünftige Innovationen gesehen werden.

Wie bereits dargestellt spielen die Wahl und Konzentration des Gefrierschutzadditivs eine maßgebliche Rolle, die das Zellüberleben positiv und negativ beeinflussen können.<sup>82</sup> Nichtsdestotrotz sind Gefrierschutzadditive für die Kryokonservierung essenziell, sodass die meisten Protokolle nicht auf die Verwendung von Gefrierschutzadditiven verzichten.

#### **2.3.4. Gefrierschutzadditive**

Die Kryokonservierung ist nicht nur ein Phänomen, das ausschließlich im Labor auftritt. Auch in der Natur müssen Tiere und Pflanzen durch Anpassung an die Kälte ihr Überleben sichern. So wurde für das Bärtierchen das Überleben von Temperaturen im Millikelvin Bereich beschrieben.<sup>83</sup> Auch größere Lebewesen, wie zum Beispiel fast alle Invertebraten sowie einige Reptilien, weisen eine hohe Kältetoleranz auf. Dies wird durch Frostschutzproteine (*anti-freeze protein*), Nukleierungsmittel (*ice nuclear agents*) sowie durch eine Dehydratation der Zelle im Rahmen der Unterkühlung erreicht. So werden die Eiskristallbildung und das damit einhergehende Risiko der Rekristallisation größtenteils auf den Extrazellulärraum reduziert, sodass der Intrazellulärraum intakt bleibt. Des Weiteren wird bei solchen Organismen eine höhere Konzentration an Zuckern mit kleinem Molekulargewicht sowie an stark eutektischen Lösungsmitteln festgestellt.<sup>84,85</sup>

Dass die Tiere an niedrige Temperaturen angepasst sind, erkennt man auch bei der Betrachtung der Optima mancher Enzyme. So verschiebt sich das Temperaturoptimum der Enzyme in kältere Bereiche. Das Bärtierchen kann dadurch Temperaturen im Bereich von -253°C für 45 Minuten überleben. Bemerkenswert ist, dass das Transkriptom keine signifikanten Veränderungen nach dem Einfrieren aufweist.<sup>83</sup>

Damit das Zellüberleben erhöht und der Bereich der optimalen Kühlrate verbreitert wird, werden im Rahmen des Einfrierprozesses Gefrierschutzadditive verwendet.<sup>67</sup>

Die Erkenntnisse, die aus der Natur gesammelt wurden, werden heutzutage auf komplexere Organismen angewandt und spielten bei der Generierung von Kryoprotektiva eine wichtige Rolle. Entdeckt wurde das Prinzip der Kryoprotektiva durch Polge im Jahre 1949. Dabei wurde durch eine fehlerhafte Beschriftung einer Flasche eine artifizielle Kryotoleranz bei Spermatozoen induziert.<sup>61</sup>

### 2.3.4.1 Penetrierende Gefrierschutzadditive

Gefrierschutzmittel lassen sich je nach Molekulargewicht in penetrierende und nicht-penetrierende Kryoprotektiva einteilen.<sup>86</sup> Penetrierende Gefrierschutzmittel können aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts durch die semipermeable Plasmamembran der Zelle diffundieren und so einen Teil des intrazellulären Wassers ersetzen. Durch Erniedrigung des Gefrierpunkts aufgrund der kolligativen Eigenschaften der niedermolekularen Gefrierschutzadditive geschehen zellschädigende Mechanismen erst bei niedrigeren Temperaturen. In der Folge minimieren sich die Effekte der Dehydratation und eine verminderte Salzkonzentration der verbleibenden Lösung kann beschrieben werden.<sup>66,87,88</sup> Außerdem wird dadurch die Kinetik der Eiskristallisation verlangsamt, sodass die Schädigung durch intrazelluläre Kristallisation weniger wahrscheinlich ist.<sup>67</sup> In der Folge wird durch extrazelluläre Eisbildung die Plasmamembran stabilisiert.<sup>89</sup> Bis heute ist jedoch die Aufschlüsselung der genauen Mechanismen, die die kryoprotektive Wirkung erklären, nicht vollständig verstanden.<sup>27</sup>

Zu den niedermolekularen Gefrierschutzmitteln gehören unter anderem Glyzerin, Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie Polyole wie zum Beispiel 1,2-Propandiol, auch Ethylenglykol genannt.<sup>90</sup> DMSO hat einen Gefrierpunkt bei 18,5°C und ist in der Beschaffung günstig, sodass es in der Arbeit mit Stammzellen als besonders attraktiv gilt. Glyzerin hat einen Gefrierpunkt bei -37,8°C bei einem Mischverhältnis von 70% (v/v) Glyzerin und 30% (v/v) Wasser. Reines Ethylenglykol hat einen Gefrierpunkt von -12°C. Mischt man Ethylenglykol mit Wasser in einem Verhältnis von 60% (v/v) Ethylenglykol und 40% (v/v) Wasser, so erniedrigt sich der Gefrierpunkt auf -45°C, was Ethylenglykol als Kryoprotektivum sehr effektiv macht.<sup>91</sup>

Trotz zahlreicher positiver Charakteristika werden penetrierenden Gefrierschutzadditiven toxische Eigenschaften zugeschrieben. Nach der Kryokonservierung mit DMSO wurden vermehrt veränderte Zellen beschrieben. Diese Veränderung wurde auf Prozesse der Methylierung der DNS sowie auf Histonmodifikationen zurückgeführt.<sup>91</sup>

Überdies wurde eine Induktion der Differenzierung der humanen embryonalen Stammzellen beschrieben.<sup>92</sup> Bei der Anwendung von Ethylenglykol wurden medizinisch relevante, unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben, so zum Beispiel Pneumonien und Irritationen des Gastrointestinaltraktes.<sup>91</sup> Es konnte beispielsweise ein Patient verzeichnet werden, bei dem es nach akuter Intoxikation mit Ethylenglykolbutylether zu einem Lungenödem kam.<sup>93</sup>

Glyzerin hingegen gilt als weniger toxisch.<sup>91</sup> Die zelltoxischen Eigenschaften lassen sich durch eine möglichst geringe Einwirkzeit des jeweiligen Stoffes auf die Zellen verringern.<sup>94</sup>

Ein Problem, das allen niedermolekularen Gefrierschutzmitteln zugeschrieben wird, ist das Bewirken von osmotischem Stress auf die Zelle. Dies liegt darin begründet, dass die Plasmamembran für das jeweilige Gefrierschutzmittel eine niedrigere Permeabilität als für



Wasser aufweist.<sup>95</sup> Folglich kann je nach osmotischen Gradienten bei Überschreiten der Toleranzgrenze eine schädigende Wirkung des Gefrierschutzadditivs festgestellt werden, sodass ein schrittweises Hinzufügen bzw. eine Entfernung des Kryoprotektivs erforderlich wird.<sup>96</sup> Damit kann beispielsweise nach dem Auftauen beim Auswaschen des Kryoprotektivums aus der Zelle ein zu starkes Anschwellen der Zelle verhindert werden.<sup>65</sup> Dies steht jedoch im Widerspruch zur zuvor beschriebenen zelltoxischen Eigenschaft der Gefrierschutzmittel, da durch ein schrittweises Hinzufügen bzw. Entfernen die Kontaktzeit der Zellen mit dem Gefrieradditiv zunimmt.

#### **2.3.4.2 Nicht penetrierende Gefrierschutzadditive**

Nicht penetrierende Gefrierschutzadditive können weiter eingeteilt werden in osmotisch inaktive Makromoleküle und osmotisch aktive, kleinere Moleküle.<sup>86</sup> Da ihr Molekulargewicht zu hoch ist, können sie die Zellmembran nicht passieren. Zu den nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln gehören Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol, Trehalose und Hydroxyethylstärke.<sup>91,97,98</sup> Auch Saccharose als Disaccharid gehört zu den nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln.<sup>66</sup>

Nicht penetrierende Gefrierschutzmittel schützen die Zelle unter anderem durch kolligative Eigenschaften.<sup>99</sup> Unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der gelösten Stoffe wird so eine Erniedrigung des Gefrierpunkts bewirkt.<sup>65</sup> Überdies wird durch den Einsatz von nicht penetrierenden Gefrierschutzadditiven die Viskosität erhöht, sodass durch eine verminderte Diffusionskapazität einer zu starken Dehydratation der Zelle entgegengewirkt wird.<sup>67</sup> Die Erhöhung der Viskosität beeinflusst ebenfalls die Geschwindigkeit des Wasserein- und ausstroms. Folglich gelten nicht penetrierende Gefrierschutzadditive als osmotischer Puffer.<sup>100</sup> Eine veränderte Viskosität geht ebenfalls mit einer geringeren mechanischen Zellschädigung einher.<sup>101</sup> Des Weiteren wird die kryoprotektive Eigenschaft durch eine Erniedrigung der Salzkonzentration im Extrazellulärraum begründet.<sup>99,100</sup> Gemäß der *Water replacement* Theorie stabilisieren Zucker die Membran, indem die Verringerung des Abstands zwischen Membranlipiden bei Dehydratation verhindert wird.<sup>102</sup> Dies trägt maßgeblich zu einer verbesserten Membranintegrität bei (siehe 2.2.2). Demnach können nicht penetrierende Gefrierschutzmittel die Membran stabilisieren.<sup>65</sup>

Ein großer Vorteil der nicht penetrierenden Gefrierschutzadditive ist der geringe osmotische Druck, den das jeweilige Gefrierschutzmittel auf die Zelle ausübt. So gilt die Toxizität von nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln generell als niedriger als die Toxizität von penetrierenden Gefrierschutzmitteln. Aufgrund ihrer kaum ausgeprägten Toxizität müssen Zellen nach dem Auftauen beispielsweise mit Hydroxyethylstärke nicht mehr gewaschen werden.<sup>67</sup>

Durch eine Kombination von penetrierenden und nicht penetrierenden Kryoprotektiva kann durch Reduzierung der Toxizität der niedermolekularen Gefrierschutzadditiva eine Erhöhung der Zellüberlebenswahrscheinlichkeiten bewirkt werden.<sup>103</sup>

### **2.3.5. Langsame Kühlraten**

Nicht nur die Wahl der Gefrierschutzadditiva, auch die Kühlrate hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Zellüberleben. Je nach Kühlrate kann man zwischen zwei verschiedenen Einfrierprozessen differenzieren. Beim langsamen Einfrieren werden Kühlraten zwischen 0,3-1°C/min sowie eine geringe Konzentration von Kryoprotektiva verwendet.<sup>104</sup> Hier hat das intrazelluläre Wasser genug Zeit, um entlang des osmotischen Gradienten während des Abkühlens in den Extrazellulärraum zu gelangen. Die Dehydratation der Zelle ist in diesem Fall ausgeprägt, wohingegen die intrazelluläre Bildung von Eiskristallen erniedrigt ist (siehe 2.3.3).

### **2.3.6. Verglasung**

Bereits 1937 erkannte Luyet die schädigenden Auswirkungen der Kristallisation auf die Zellen und postulierte, dass eine effektive Kryokonservierung idealerweise ohne Eiskristallisation ablaufen sollte.<sup>105</sup>

Bei der Verglasung, auch Vitrifikation genannt, erhöht sich die Viskosität der Lösung so sehr, dass die Bildung von Eiskristallen verhindert wird. Folglich erstarrt die Lösung glasartig, ohne Bildung von Eiskristallen. Voraussetzung dafür ist eine hohe Kühlrate, sodass das intrazelluläre Wasser nicht genug Zeit hat, in größerem Ausmaß den Extrazellulärraum zu erreichen. Die hohen Abkühlraten können durch ein Schockfrieren der Zellen in Flüssigstickstoff erreicht werden.<sup>27,106</sup> Dies ermöglicht den direkten Übergang der verbleibenden, nicht kristallisierten Lösung aus einer flüssigen in eine feste Phase.<sup>65</sup> Neben einer hohen Kühlrate ist der Gebrauch von Kryoprotektiva in hoher Konzentration eine weitere Voraussetzung, sodass möglichst schnell eine heterogene Nukleation erreicht werden kann.<sup>106,107</sup>

Bei den verwendeten Gefrierschutzmitteln handelt es sich oft um eine Kombination aus penetrierenden und nicht-penetrierenden Kryoprotektiva, damit so die Toxizität reduziert werden kann. Außerdem sollte ein Gewöhnen der Zellen an die veränderten osmolaren Verhältnisse durch graduelles Hinzufügen der Gefrierschutzmittel erfolgen, sodass die Membranintegrität durch den entstehenden osmotischen Gradienten nicht zu sehr geschädigt wird.<sup>108</sup> Eine Vorbehandlung der Zellen mit Sacchariden wird dabei empfohlen, um so eine stabile Dehydratation der Zelle zu erreichen und eine möglichst nicht schädigende Glasbildung zu ermöglichen.<sup>97</sup>

Im Vergleich zum Einfrieren mit langsamen Kühlraten verzeichnet die Verglasung höhere Überlebensraten von undifferenzierten Kolonien, jedoch weist diese Methode auch einige Nachteile auf.<sup>109</sup> So werden höhere Konzentrationen an Gefrierschutzmitteln benötigt, sodass der potenziell zellschädigende Effekt erhöht wird. Außerdem ist die Methodik mit mehr technischem Aufwand als das langsame Einfrieren verbunden. Des Weiteren besteht Kontakt zwischen dem Flüssigstickstoff und den Zellen beim „*Open pulled Straw*“-Vitrifikationsverfahren, sodass die Gefahr der Kontamination besteht.<sup>27</sup>

Flüssigstickstoff muss regelmäßig kontrolliert werden und geht mit hohen Betriebskosten einher. Ist das Kryoröhrchen zu gering befüllt, hat der flüssige Stickstoff eine hohe Neigung, in das Kryoröhrchen einzudringen, was in einer Kontamination resultieren kann. Befüllt man das Kryoröhrchen hingegen zu sehr, so gelangt weniger Stickstoff in das Röhrchen. Aufgrund des Druckunterschieds beim Auftauen besteht eine Explosionsgefahr, wenn flüssiger Stickstoff in das Kryoröhrchen eingedrungen ist. Durch den Verzicht auf Flüssigstickstoff wäre die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der oben genannten Probleme geringer.<sup>66</sup>

Der größte Nachteil der Verglasung ist jedoch, dass lediglich eine geringe Anzahl an Zellen gleichzeitig eingefroren werden kann. So ist die Methode für die langfristige Lagerung hoher Quantitäten an Zellen ungeeignet.<sup>27</sup>

Beim Auftauen der Zellen nach Vitrifikation besteht die Gefahr der Devitrifikation. Dies ist ein Prozess, der beim Auftauen des vorher amorph-glasartigen Zustandes der Lösung auftreten kann. Im Rahmen der Devitrifikation kommt es zur Bildung von Eiskristallen, welche das Zellüberleben negativ beeinflussen können.<sup>77</sup> Dies liegt darin begründet, dass im Rahmen des Einfrierens bis zur Verglasung der Lösung bereits kleine Eiskristalle entstehen können.<sup>104</sup> Ist die Temperatur beim Auftauen zu gering, so verflüssigt die Lösung intrazellulär, bevor der Schmelzpunkt im Extrazellulärraum passiert wurde. In diesem Bereich besteht das Risiko für intrazelluläre Eiskristallisation.<sup>65</sup>

Ein weiteres Problem beim Auftauen nach Verglasung ist der einwirkende osmotische Stress auf die Zelle bei Zugabe des Kulturmediums. Die Zugabe des Kulturmediums bewirkt eine Verdünnung des Kryoprotektivums. An die neuen osmotischen Bedingungen müssen sich die Zellen gewöhnen, wobei der osmotische Schock nicht zu stark sein darf. So werden die Zugabe von Sacchariden in das Auftaumedium und ein graduelles, jedoch nicht zu langsames Hinzufügen des Kulturmediums empfohlen.<sup>110,111</sup>

### **2.3.7. Stand der Technik bei der Kryokonservierung von humanen Stammzellen**

Die Methode der Verglasung wurde ursprünglich für das Einfrieren von Rinderovarien und Rinderembryonen konzipiert.<sup>106</sup> Das ursprüngliche Protokoll der Kryokonservierung von Rinderovarien und Rinderembryonen wurde 2001 auf hESCs übertragen.<sup>109</sup> Dies erlaubt

jedoch nur ein Einfrieren von Zellen in geringer Quantität.<sup>106</sup> Dabei wurde im Originalpaper eine niedrige Rate von 30% an undifferenzierten Stammzellen festgestellt.<sup>109</sup> Die Arbeit mit hESCs stellt sich als problematisch dar, da die Zellen auf einen engen Zell-Zell-Kontakt angewiesen sind und lediglich als dreidimensionale Aggregate wachsen. Des Weiteren erfordert die Arbeit mit hESCs klassisch eine Co-Kultur mit primären, embryonalen Mäusefibroblasten (PMEF).<sup>112</sup> Zunehmend werden jedoch Verfahren verwendet, bei denen humane pluripotente Stammzellen ohne PMEFs kultiviert werden.<sup>113</sup>

Die Kryokonservierung von frei suspendierten Einzelzellen gilt als einfachste Methode, da sich die Zellen in der Lösung frei bewegen können. Diese Methode findet seit Jahren Anwendung im Alltag in nahezu allen Laboren.<sup>67</sup> Da die Zellüberlebensraten bei niedrigen Kühlraten eher gering waren und bei der Verglasung die bereits genannten Probleme auftraten, wurde die Kryokonservierung von adhärenen hESCs-Kolonien erprobt. Dabei wurden speziell angefertigte Kulturplatten mit Schraubverschluss entwickelt, die direkt in Flüssigstickstoff gelagert wurden. So sollte idealerweise ein System generiert werden, welches zur automatisierten Anwendung genutzt werden kann, um so große Zellmengen einfrieren zu können. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die herkömmlich benutzten Zellkulturplatten für die Kryokonservierung nicht geeignet sind, sodass neue Zellkulturplatten für diesen Zweck bereitgestellt werden müssten. Des Weiteren ist durch den direkten Kontakt mit Flüssigstickstoff die Gefahr der pathogenen Transmission stark erhöht.<sup>27,114</sup>

Nichtsdestotrotz wird auch weiterhin an modifizierten Protokollen zur Kryokonservierung adhärenter Zellen gearbeitet. So verzeichnen modifizierte Protokolle, die beispielsweise mit Microcarriern arbeiten, höhere Überlebensraten undifferenzierter Zellen.<sup>115</sup>

Das Erproben verschieden zusammengesetzter Einfrierlösungen ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung.<sup>116</sup> Zwar gilt DMSO als Gefrierschutzadditiv der Wahl beim Einfrieren von hiPSCs, jedoch wurden negative Effekte wie zum Beispiel die Induktion von Differenzierung sowie eine generelle Zytotoxizität beschrieben.<sup>117</sup>

Auch die Kryokonservierung unter serumfreien bzw. xenofreien Bedingungen wird derzeit erforscht. So kann das Risiko für eine Kreuzübertragung von Pathogenen reduziert werden. Da manche Lösungen in ihrer Zusammensetzung nicht konsistent oder chemisch nicht klar definiert sind, schränkt dies die Reproduzierbarkeit der Experimente ein.<sup>27</sup>

Die Verwendung von verschiedenen Molekülen im Rahmen der Kryokonservierung wird ebenfalls diskutiert. So konnte durch Zusatz von Z-VAD-FMK, einem Caspase-Inhibitor, im Einfriermedium sowie im Auftaumedium eine Erhöhung der Zellüberlebensrate erreicht werden. Nichtsdestotrotz wiesen die Zellen dieselben Differenzierungsraten wie jene ohne Caspase-Inhibitoren auf.<sup>118</sup> Auch die Verwendung des ROCK-Inhibitors Y-27632 scheint das Zellüberleben positiv zu beeinflussen.<sup>119,120</sup>

Des Weiteren wird die Benutzung von Einfrierautomaten, die eine kontrollierte Einhaltung definierter Kühlraten gewährleisten, derzeit erforscht. So gelten die generierten Ergebnisse der Einfrierautomaten als objektiver und demnach reproduzierbarer, jedoch stellen eine nicht stetige Verfügbarkeit der Maschinen sowie die damit verbundenen hohen Kosten bei der Beschaffung Nachteile dar.<sup>27</sup> Nichtsdestotrotz konnte durch die Verwendung automatisierter Einfrierautomaten eine erhöhte Effizienz bei der Kryokonservierung festgestellt werden.<sup>121</sup>

### **2.3.8. Problematik bei der Kryokonservierung komplexerer Systeme**

Die Kryokonservierung komplexerer Systeme in Form von dreidimensionalen Aggregaten als ganze Gewebestücke ist Bestandteil der heutigen Forschung. Auf diese Art können quantitativ mehr Zellen kryokonserviert werden, jedoch geht dies mit einer Vielzahl von Problemen einher. Insbesondere die Kryokonservierung von hiPSCs in größerer Menge ist in der Anwendung derzeit noch beschränkt. Der maßgebliche Vorteil von Einzelzellen in einer Suspensionslösung ist die freie Beweglichkeit der Zellen, sodass ein gleichmäßiger Austausch mit der Umgebung gewährleistet werden kann. In einem dreidimensionalen Aggregat können sich die Zellen nicht frei bewegen und es besteht folglich eine reduzierte Fläche zur Kompensation des osmotischen Gradienten. Überdies stehen Komponenten der Umgebung dem Inneren des Aggregats nicht direkt zur Verfügung, sodass die Zellen im Inneren auf eine intakte Zell-Zell-Kommunikation bzw. Zell-Interstitium-Transport angewiesen sind.<sup>67</sup>

Daraus resultieren je nach Zelltyp und Konformation spezifische Diffusionszeiten, die eine hohe Variabilität aufweisen und somit eine Reproduzierbarkeit erschweren.<sup>122</sup> Überdies kann ein hoher Konzentrationsunterschied der Gefrierschutzadditive festgestellt werden. Äußere Zellen sind demnach für längere Zeit dem Gefrierschutzadditiv ausgesetzt, wohingegen aufgrund der geringen Diffusionsrate im Inneren des Aggregats eine zu geringe Konzentration des Gefrierschutzmittels herrscht. Demnach besteht die Gefahr einer starken Dehydratation sowie eines hohen zelltoxischen Effekts des Kryoprotektivums im Äußeren des dreidimensionalen Aggregats, während zellschädigende Mechanismen im Inneren des Aggregats eher auf Phänomene der Eiskristallisation beruhen.<sup>123</sup>

So konnte bereits 1991 bei einem für eine Stunde in DMSO inkubierten 1cm<sup>3</sup> Schweinemyokard ein Konzentrationsunterschied von 1M pro Zentimeter im Gewebe nachgewiesen werden.<sup>124</sup> Gemäß der Zwei-Faktor-Hypothese muss für ein optimales Zellüberleben nach der Kryokonservierung eine optimale Konzentration des Gefrierschutzadditivs erreicht werden, um so die Wahrscheinlichkeit für Gefrierschäden zu minimieren.<sup>69</sup>

Des Weiteren besteht zwischen den Zellen im Äußeren und im Inneren des Zellaggregats ein Gradient in Bezug auf den Energietransport.<sup>67</sup> Folglich dauert es länger, bis eine adäquate

Kühlrate im Inneren beim Einfrieren und eine hohe Auftaurate beim Auftauen aufgebaut werden können. Dies kann zur Induktion von Rissen im Gewebe führen.<sup>125,126</sup>

Ein weiteres Problem ist, dass Protokolle, die das Einfrieren von hiPSCs als Einzelzellen optimiert haben, auf das Einfrieren von dreidimensionalen Zellaggregaten nicht anwendbar zu sein scheinen.<sup>27</sup> Es ist dabei nicht ausreichend analysiert, inwiefern eine intrinsische Individualität zwischen Einzelzellen und dreidimensionalen Aggregaten bezüglich der Membranpermeabilitäten und der daraus entstehenden Risiken besteht.<sup>67</sup> So wird postuliert, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit von intrazellulärer Eiskristallisation durch den Zell-Zell-Kontakt im dreidimensionalen Aggregat erhöht wird.<sup>127</sup>

Zudem kommt die Tatsache, dass bisherige Protokolle sogar für Einzelzellen noch nicht optimiert wurden und einige Prozesse der Kryokonservierung nicht komplett verstanden sind. Des Weiteren variiert die Interpretation der Resultate, je nachdem, auf welchen Parameter man den Fokus legt. So zeigt das Beispiel des ROCK Inhibitors, dass bei besonderer Fokussierung des Zellüberlebens die Zugabe des ROCK Inhibitors zum Einfriermedium sinnvoll erscheint, da der ROCK Inhibitor das Zellüberleben von dissoziierten hESCs nach der Kryokonservierung erhöht. Ist das primäre Ziel jedoch eine möglichst schnelle Bildung von hESCs-Kolonien, so würde man den ROCK Inhibitor nicht in das Einfriermedium geben, da dies keinen signifikanten Unterschied in der Bildung von hESCs-Kolonien bewirkt. Wurde der ROCK Inhibitor jedoch in das Kulturmedium nach dem Auftauen gegeben, so konnte die Bildung von hESCs-Kolonien um bis zu 50-100x beschleunigt werden. Nicht nur die Wahl, ob ein Molekül (z.B. der ROCK Inhibitor) bei der Kryokonservierung hinzugefügt wird, sondern auch die Entscheidung, in welchem Teilschritt des Protokolls das Molekül zur Lösung hinzugegeben wird, hat einen potenziellen Einfluss auf den zu untersuchenden Parameter.<sup>27,119,120</sup> Anhand dieses Beispiels kann demnach die Vielschichtigkeit des Problems betont werden.

Da nicht nur ein Parameter, sondern das Zusammenspiel von einer Vielzahl an Parametern das Zellüberleben beeinflusst, würde das Versuchen durch Trial-and-Error eine Anzahl an Experimenten in hohen quantitativen Bereichen erfordern.<sup>128</sup>

Des Weiteren stellt die Analyse von dreidimensionalen Aggregaten ein Problem dar.<sup>27</sup> Möchte man die Zellen analysieren, so muss das Aggregat in Einzelzellen überführt werden. Da dies das Zellüberleben durch mechanische und osmotische Lyse negativ beeinflusst, stellt die möglichst objektive und reproduzierbare Darstellung der Ergebnisse ein Problem dar.<sup>67</sup>

Im Zuge der Forschung wurde festgestellt, dass eine gemischte Population von Einzelzellen und dreidimensionalen Aggregaten die Erholungsrate nach dem Auftauen positiv beeinflusst.<sup>129</sup> Auch weitere positive Beispiele wurden in den letzten Jahren verzeichnet. Als positives Beispiel für die erfolgreiche Kryokonservierung von ganzem Gewebe gilt die Spalthaut.<sup>130</sup>

Auch im kardiochirurgischen Gebiet wird die Kryokonservierung seit über 30 Jahren angewandt. Bei der Allo-Transplantation von kryokonservierten Herzklappen werden große postoperative Erfolge verzeichnet. Doch auch hier wird postoperativ von einer beschleunigten Insuffizienz der implantierten Herzklappen bei Neugeborenen und Kindern berichtet.<sup>131</sup>

Die Kryokonservierung des menschlichen Herzens als gesamtes Organ ist bislang nicht möglich. Bereits seit über 60 Jahren arbeitet man an der Erstellung eines Protokolls zur Kryokonservierung komplexerer Gewebe. So kam es dazu, dass 1961 Hamsterherzen mit 15% Glycerol kryokonserviert wurden. Erste Erfolge konnten bei der Kryokonservierung der Herzen bei -20°C verzeichnet werden, da rhythmische Kontraktionen nach dem Auftauen festgestellt wurden. Bei der Kryokonservierung unter -20°C wurden die Organe jedoch zu stark geschädigt und die Kardiomyozyten waren zum Großteil dysfunktional und avital.<sup>132,133</sup>

Seit jeher wurde versucht, ein geeignetes Kryokonservierungsprotokoll zu generieren, jedoch stellt dies zahlreiche Kryoforscher weltweit vor mehrere Hindernisse. Eine erfolgreiche Kryokonservierung des Herzens mit hohen Zellüberlebensraten nach dem Auftauen würde einen medizinischen Durchbruch darstellen.

## **2.4. Kryokonservierung in der Gynäkologie**

### **2.4.1. Stand der Technik bei der Kryokonservierung von humanen Oozyten und humanen ovariellen Geweben**

Trotz bisheriger massiver Probleme bei der Kryokonservierung ganzer Organe lässt sich feststellen, dass einige Gewebetypen für die bisherige Art der Kryokonservierung besser geeignet sind als andere.<sup>59,133</sup> Als ein positives Beispiel lässt sich die Kryokonservierung im Bereich der Reproduktionsmedizin nennen. Bereits 1949 wurde die erste erfolgreiche Kryokonservierung von Polge durchgeführt, indem Glyzerin zu Spermatozoen gegeben und diese eingefroren wurden.<sup>61</sup>

Auch die Kryokonservierung von humanen ovariellen Geweben verzeichnet große Erfolge. Eine erste erfolgreiche Kryokonservierung von ovariellm Gewebe konnte 1996 erreicht werden. Die Atresierate der kryokonservierten Follikel lag bei 19% und unterschied sich somit nicht signifikant von den nicht-kryokonservierten Follikeln. Außerdem konnte nach der Kryokonservierung keine zentrale Nekrose selbst bei größeren Gewebestücken festgestellt werden.<sup>134</sup> Durch mehrfache Modifikation des Protokolls konnten seit der ersten humanen Lebendgeburt 2004 bis zum Jahre 2019 weltweit 130 Lebendgeburten nach Transplantation von kryokonservierten ovariellen Geweben verzeichnet werden.<sup>135,136</sup> Um die Erfolge der Kryokonservierung des ovariellen Gewebes besser nachvollziehen zu können, bedarf es jedoch einer näheren Betrachtung dieser Thematik.

Schätzungsweise 276.000 Menschen unter 44 Jahren erhielten 2018 die Diagnose Krebs. Auffällig ist dabei, dass der Frauenanteil mit ca. zwei Dritteln der Erkrankten in dieser Altersgruppe wesentlich höher ist als bei Männern. Durch stetige Verbesserung therapeutischer Mittel kann bei manchen Frauen eine Lebensverlängerung sowie die Remission der Erkrankung erreicht werden.<sup>135</sup>

Da bei der systemischen Therapie häufig Chemotherapeutika zum Einsatz kommen, muss die gonadotoxische Wirkung bedacht werden. Die Wahrscheinlichkeit variiert je nach eingesetztem Wirkstoff stark. Nichtsdestotrotz weisen häufig eingesetzte Chemotherapeutika ein hohes Risiko für die Induktion der ovariellen Insuffizienz auf: Bei Doxorubicin oder Mitoxantron beträgt das Risiko zwischen 30 und 60%, bei Cyclophosphamid oder Busulphan 70% und bei einer Hochdosis-Chemotherapie sogar 92%. So bedarf es einer effizienten Technik, die auf einen Erhalt der Reproduktion abzielt.<sup>137</sup>

Doch die Funktion der Ovarien lässt sich nicht nur auf die Generierung von Oozyten beschränken. So leiden Frauen mit ovarieller Insuffizienz auch an menopausaler Symptomatik. Dazu gehören ein erhöhtes Risiko für Hypertonie, Osteoporose, Libidoverlust und thermale Dysregulation.<sup>135</sup>

Indikationen für eine Kryokonservierung weisen ein breites Spektrum auf und reichen von inflammatorischen Erkrankungen wie zum Beispiel dem systemischen Lupus erythematodes, bis hin zu pelvinen und extrapelvinen Tumorerkrankungen.<sup>137</sup> Neben dem Krankheitsbild sollten auch andere Parameter vor definitiver Indikationsstellung der Kryokonservierung hinzugezogen werden. Dabei spielt unter anderem das Alter der Patientin eine wichtige Rolle. So lässt sich eine Beschleunigung der follikulären Depletion ab einem Alter von ca. 37-38 Jahren feststellen.<sup>138</sup>

Des Weiteren sollte stets bedacht werden, dass die Follikel innerhalb des ovariellen Kortex nicht homogen verteilt sind. Dies macht mehrere laparoskopische Gewebeentnahmen notwendig.<sup>139</sup>

Außerdem unterscheidet man zwischen verschiedenen Methoden, welche auf eine Aufrechterhaltung der ovariellen Restfunktion nach der Kryokonservierung abzielen. So kann das ovarielle Gewebe nach dem Auftauen orthotop (auf die ursprüngliche Stelle) transplantiert oder heterotop (an eine andere Stelle) platziert werden. Wichtig zu erwähnen ist, dass ein heterotopes Transplantat eine *in vitro* Fertilisation erforderlich macht. Außerdem kann das ovarielle Gewebe *in vitro* wachsen und reifen, sodass man Oozyten erhält, die sich in der Metaphase II befinden und für eine *in vitro* Fertilisation benutzt werden können. Die letztere Methode wird lediglich an Patientinnen angewandt, bei denen eine hormonelle Therapie oder eine Reimplantation des ovariellen Gewebes aufgrund von residuellen malignen Zellen nicht durchgeführt werden kann.<sup>137</sup>



Die weltweit erstmalig durchgeführte heterotope Reimplantation von ovariellm Gewebe erfolgte im Jahr 1987. Dabei wurde einer an Morbus Hodgkin erkrankten Patientin ihr Ovar an den linken Oberarm autotransplantiert. Durch eine Oophoropexie auf der einen und eine Oophorektomie auf der anderen Seite konnten zwei Monate später ein regulärer Menstruationszyklus und eine intermittierende Entwicklung der ovariellen Follikel festgestellt werden. Nach einem Jahr konnten reife Oozyten aus dem Transplantat extrahiert werden.<sup>140</sup> So stellt die erfolgreiche Autotransplantation von ovariellen Geweben einen medizinischen Durchbruch dar. Es konnte die Rate an Patientinnen, die eine Induktion der Ovulation mit exogen zugeführten Gonadotropinen sowie ein klinisches Monitoring erhielten, reduziert werden.<sup>134</sup>

#### **2.4.2. Ablauf der Kryokonservierung bei humanen ovariellen Geweben**

Da die Kryokonservierung von ovariellm Gewebe und Oozyten ein etablierteres Verfahren ist, findet die Anwendung von Einfrierautomaten, welche kontrollierte Kühlraten erlauben, in höherem Ausmaß als bei der Kryokonservierung von Stammzellen statt. Auch bei der Kryokonservierung von ovariellm Gewebe unterscheidet man zwischen dem konventionellen, langsamen Einfrieren und der Verglasung.<sup>135</sup>

Die Prinzipien des langsamen Einfrierens und schnellen Auftauens wurden bereits beschrieben (siehe 2.3.5 und 2.3.6). Bei der Kryokonservierung im gynäkologischen Bereich ist die Kombination von penetrierenden und nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln gebräuchlich. Dabei muss beachtet werden, dass das ovarielle Gewebe aus mehreren Zelltypen mit unterschiedlichen Diffusionskapazitäten besteht, sodass eine ausreichende, aber nicht zu lange Inkubation mit den Gefrierschutzadditiven erreicht werden sollte.<sup>135</sup>

Die meisten Protokolle zur Kryokonservierung von ovariellm Gewebe mit langsamen Kühlraten basieren auf dem Protokoll von Gosden et al. (1994)<sup>135,141</sup>. So weisen die Zellen nach dem Auftauen trotz Modifikationen des Protokolls ähnlich hohe Überlebensraten auf, was für eine Stabilität des ovariellen Gewebes spricht.<sup>135</sup>

Obwohl die Ergebnisse bei der Verglasung von ovariellm Gewebe vielversprechend sind, konnten bis 2019 erst zwei Lebendgeburten verzeichnet werden, bei denen vitrifiziertes ovariellm Gewebe benutzt wurde.<sup>135</sup> Da bei der Verglasung noch kein standardisiertes Protokoll für die Kryokonservierung von ovariellm Gewebe besteht und das reproduktive Potenzial noch kein hohes Niveau erreicht, bedarf es auch hier einer Verbesserung bestehender Protokolle.

Ein Vergleich der beiden Einfriermethoden zeigte, dass vitrifiziertes ovariellm Gewebe nach dem Auftauen eine stark verminderte Expression des GAPDH-Gens aufwies. GAPDH ist ein Haushaltsgen und spielt in vielen Stoffwechselwegen, unter anderem der Glykolyse, eine wichtige Rolle.<sup>142</sup>

Nichtsdestotrotz scheint es, als würde die Entwicklung der Kryokonservierungsprotokolle für ovarielles Gewebe effizienter geschehen als jene Protokolle der Kryokonservierung von hiPSCs. So fand in Deutschland 2011 die erste Lebendgeburt nach Retransplantation von kryokonserviertem ovarielltem Gewebe statt.<sup>143</sup>

Bei der Kryokonservierung des Ovars treten ähnliche Probleme wie bei den Stammzellen auf: Auch bei der Kryokonservierung von ovarielltem Gewebe stellt die homogene Perfusion des dreidimensionalen Aggregats mit Kryoprotektoren die Laboratorien vor technische Herausforderungen.<sup>135</sup> Zwar konnte durch Erhöhung der DMSO Konzentration auf 20% sowie durch eine niedrigere Sättigungstemperatur bei -11°C die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von intrazellulärer Eisformation erniedrigt werden, jedoch verbesserten diese Modifikationen das Überleben der präantralen Follikel nach Xenotransplantation nicht.<sup>144</sup> Des Weiteren bedarf die mikrochirurgische Anastomosierung von Blutgefäßen nach Retransplantation von Ovarien einer enormen chirurgischen Expertise.<sup>145,146</sup> Ein weiteres Problem, das nach der Kryokonservierung und Reimplantation des ovariellen Gewebes auftreten kann, ist der Transfer von malignen Zellen. So ist es von hoher Bedeutsamkeit, jegliche residuale Malignität vor und nach der Kryokonservierung auszuschließen.<sup>147</sup>

Um die Probleme teilweise zu lösen, wurde das Protokoll zur Kryokonservierung von ovarielltem Gewebe modifiziert.<sup>110,148-151</sup>

In dieser Arbeit wurde das modifizierte Protokoll zur Kryokonservierung von humanen ovariellen Geweben<sup>110,148-151</sup> auf hiPSCs angewandt. Da sich die gynäkologischen Protokolle zur Kryokonservierung von humanen ovariellen Geweben vom bereits etablierten Protokoll zum Einfrieren und Auftauen von hiPSCs in mehreren Aspekten differenzierten, werden die Unterschiede der beiden Protokolle im folgenden Abschnitt dargestellt.

### **2.4.3. Unterschiede zwischen den Methoden zur Kryokonservierung von humanen ovariellen Geweben und hiPSCs**

#### **I) Gefrierschutzadditiv**

Das neue Protokoll zum Einfrieren von hiPSCs basiert auf dem ursprünglichen Protokoll von Isachenko und Kollegen mit einigen Modifikationen.<sup>110,148-151</sup> Zur genauen Darstellung der Methodik siehe Abschnitt 3.2.10 sowie 3.2.11.

Im neuen Protokoll aus der Gynäkologie der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln zur Kryokonservierung von ovarielltem Gewebe werden verschiedene Gefrierschutzadditive benutzt. Dabei handelt es sich um eine Lösung aus 6% (v/v) Ethylenglykol und 6% (v/v) DMSO

und 0,15M Saccharose.<sup>151</sup> Ethylenglykol und DMSO sind penetrierende Gefrierschutzadditive, wohingegen Saccharose ein nicht-penetrierendes Gefrierschutzmittel ist.<sup>66</sup>

In dem von uns bereits etablierten Protokoll zur Kryokonservierung von hiPSCs wird zum Einfrieren eine Lösung mit 20% (v/v) DMSO benutzt. Das Einfriermedium wird im etablierten Protokoll im Gegensatz zum gynäkologischen Protokoll mit dem Kulturmedium im Verhältnis 1:1 gemischt, sodass die finale DMSO Konzentration bei 10% (v/v) liegt. Somit unterscheiden sich beide Protokolle in der Wahl der eingesetzten Gefrierschutzmittel sowie in der Konzentration der insgesamt eingesetzten Kryoprotektiva.

## II) *Saturation*/Sättigung mittels *dropping* Methode

Während bei dem von unserer Arbeitsgruppe genutzten Protokoll (siehe 3.2.5) die Expositionszeit der hiPSCs mit dem Gefrierschutzadditiv möglichst geringgehalten wird, findet in der Gynäkologie vor dem Einfrieren ein Sättigungsschritt (*Saturation*) statt. Dabei wird mittels der *dropping method* unter permanenter Oszillation der Flüssigkeit tröpfchenweise Ethylenglykol auf die Zellen gegeben. So soll einerseits ein schrittweises Heranführen der Zellen an die veränderten osmotischen Bedingungen bewirkt und andererseits eine komplette Penetration der Zellen mit dem Ethylenglykol ermöglicht werden.<sup>110</sup>

In dem bereits etablierten Protokoll findet kein Sättigungsschritt statt, da hier die hiPSCs direkt mit dem Einfriermedium schonend resuspendiert werden.

Die *dropping Methode* kann grob skizziert in Abbildung 5 dargestellt werden:

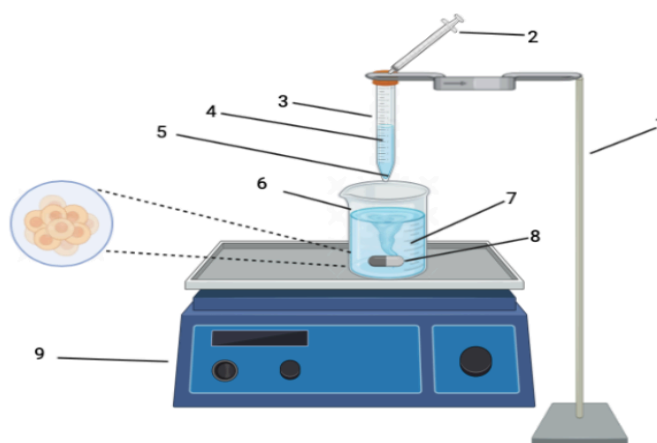


Abbildung 5: *Dropping Methode* gemäß dem gynäkologischen Protokoll

Die Abbildung wurde nach Isachenko et al. (2006)<sup>110</sup> adaptiert und mit Biorender.com erstellt.

(1) Halteapparat, (2) Injektionsrohr, (3) Röhrchen, (4) Ethylenglykol, (5) Öffnung, (6) Behälter, (7) hiPSCs (hier als dreidimensionales Aggregat dargestellt), (8) Magnet, (9) Magnetrührer

### III) Kühlrate

Zur Kryokonservierung durchläuft das ovarielle Gewebe ein Kryokonservierungsprogramm. Bei einer Starttemperatur von 0-4°C werden die Proben auf -6°C mit einer Kühlrate von -2°C/min abgekühlt. Anschließend werden die Kryoröhrchen für 10 Minuten bei -6°C gehalten. Daraufhin erfolgt eine weitere Abkühlung auf -34°C mit einer Kühlrate von -0,3°C/min. Beim Erreichen von -34°C erfolgt die Lagerung in Flüssigstickstoff. Dabei beträgt die Kühlrate -220°C/min (siehe 3.2.10). Das Auftauen erfolgt möglichst schnell bei 100°C.

Bei dem von unserer Arbeitsgruppe genutzten Protokoll werden die hiPSCs mit langsamen Kühlraten eingefroren und ebenfalls möglichst schnell wieder aufgetaut, jedoch liegt hier die Auftautemperatur bei 37°C. Somit ist die Kühlrate beim gynäkologischen Protokoll nicht konstant, jedoch als durchschnittlich höher einzuschätzen als beim etablierten Protokoll.

### IV) Einsatz von automatisierten Einfriermaschinen

Die Kryokonservierung findet in der Gynäkologie in einer automatisierten Einfriermaschine statt. Dabei wird ein Programm verwendet, welches auf die Kryokonservierung von ovariellm Gewebe spezialisiert ist. Dieses Programm arbeitet mit verschiedenen Kühlraten.<sup>149</sup>

In dem für hiPSCs bereits etablierten Protokoll werden die Kryoröhrchen in eine Isopropanol Box gestellt, um so ein möglichst gleichmäßiges Einfrieren zu gewährleisten. Bei einer Temperatur von -80°C können die Zellen zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff platziert werden.

Die Umlagerung in Flüssigstickstoff in der Gynäkologie findet bei -34°C statt. Bereits 2008 konnte gezeigt werden, dass eine Umlagerung des ovariellen Gewebes in Flüssigstickstoff ab beispielsweise -36°C, möglich ist.<sup>148</sup> So kann der Prozess der Kryokonservierung beschleunigt werden.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die Umlagerung in Flüssigstickstoff bei hiPSCs aufgrund der Kontaminationsgefahr eher bei der langfristigen Lagerung Anwendung findet<sup>66</sup>, wohingegen dies bei ovariellm Gewebe standardmäßig in dem Großteil der Fälle erfolgt. Dies liegt darin begründet, dass oftmals ovariellm Gewebe zum Erhalt der Fertilität entnommen wird und die Autotransplantation meist erst mehrere Monate oder Jahre nach Abschluss der Therapie stattfinden kann.<sup>151</sup>

Beim etablierten Protokoll wurde jedoch auf die Umlagerung in Flüssigstickstoff verzichtet, da die Zellen bereits nach sieben Tagen der Kryokonservierung aufgetaut wurden. Da eine Umlagerung in Flüssigstickstoff bei ovariellm Gewebe standardisiert erfolgt und die Zellen nicht auf Dauer bei -34°C gelagert werden können, erfolgte beim gynäkologischen Protokoll die Umlagerung in Flüssigstickstoff.

## V) Einsatz von DMSO

Im bereits etablierten Protokoll wird DMSO bereits bei Raumtemperatur hinzugefügt.

Dies unterscheidet sich vom Verfahren in der Gynäkologie, da hier die Kryoröhrchen vor Zugabe des DMSO abgekühlt werden. Demnach ist im gynäkologischen Protokoll davon auszugehen, dass die Zellen mit dem DMSO in niedrigeren Temperaturbereichen in Berührung kommen. So soll die Toxizität des DMSO verringert werden.<sup>110</sup>

## VI) Automatisierte Eisbildung (*Autoseeding*)

Während des Einfrierens in automatisierten Einfriermaschinen findet das *Autoseeding* statt. Damit wird die Initiierung der Nukleation durch lokale Herabkühlung einer Probe bei hohen Minustemperaturen beschrieben.<sup>97,152</sup>

Während beim *manuellen Seeding* eine Stelle des Kryoröhrchens unter Verwendung eines kalten Instruments gekühlt wird, übernehmen beim *Autoseeding* automatisierte Einfriermaschinen diesen Zwischenschritt.<sup>152</sup> Hintergrund der kontrollierten Bildung von Eiskristallen ist, dass es beim *Ice Seeding* zur Freisetzung jener Energie kommt, die für die Rekristallisation verantwortlich ist. Somit kann durch diesen Zwischenschritt der durch die Rekristallisierung hervorgerufene Zellschaden minimiert werden.<sup>97</sup>

In dem gynäkologischen Protokoll werden die Kryoröhrchen für 10 Minuten bei -6°C gehalten, um so eine kontrollierte Formierung von Eiskristallen zu initiieren, sodass die potenziell schädliche, unkontrollierte Genese von Eiskristallen in geringerem Ausmaß stattfindet. Der Prozess des *Autoseedings* findet beim etablierten Protokoll nicht statt.

## VII) Auftautemperaturen

Ovariell Gewebe wird beim Auftauen in kochendem Wasser bei 100°C platziert. So kann der Prozess des Auftauens verkürzt werden. Zum Schutz der Zellen befindet sich ein Präpariertupfer auf dem Boden des Röhrchens.<sup>110,148,151</sup>

Zwar möchte man bei hiPSCs die Zeit des Auftauens ebenfalls minimieren, jedoch werden die Kryoröhrchen hierbei in ein Wasserbad bei 37°C platziert, was den Prozess des Auftauens verlängert.

Bei dieser Versuchsdurchführung wurde eine Gruppe bei 100°C aufgetaut (Gruppe E). Da niedrige Überlebensraten beobachtet wurden, wurde die Auftautemperatur auf 37°C angepasst (Gruppe C, D1 und D2).

## V) Inkubation mit Saccharose-haltigem Auftaumedium und Rehydrierung

Nach dem Auftauen findet in der Gynäkologie eine schrittweise Dehydrierung und Rehydrierung statt. Dabei wird eine Saccharose-haltige Kulturlösung schrittweise gemäß der *dropping method* zum Gewebe hinzugefügt. Ziel ist dabei, die Konzentration des

Gefrierschutzadditivs graduell zu verringern und die Zellen stufenweise an veränderte osmotische Bedingungen zu gewöhnen. Anschließend findet ein Rehydrierungsschritt mit E8-haltigem Kulturmedium mittels der *dropping method* statt.<sup>110,151,153</sup>

Beim etablierten Protokoll wird auch schrittweise das Kulturmedium hinzugegeben, jedoch findet zuvor keine Inkubation mit einem Saccharose-haltigen Auftaumedium statt. Außerdem wird beim Rehydrieren die *dropping method* nicht angewendet. Des Weiteren werden die Zellen bei Raumtemperatur auch nicht mit dem Kulturmedium für längere Zeit inkubiert. Dies trägt dazu bei, dass die Zeit zwischen dem Auftauen und der erneuten Kultivierung der Zellen geringgehalten wird.

Die Unterschiede der Protokolle werden zur besseren Übersicht in Tabelle 2 zusammengefasst:

Parameter	Etabliertes Protokoll	Protokoll aus der Gynäkologie
Gefrierschutzadditiv	Einfriermedium mit 20% (v/v) DMSO + 80% (v/v) FBS	Einfriermedium mit 6% (v/v) DMSO + 6% (v/v) Ethylenglykol + 0,15M Saccharose
Endkonzentration der Gefrierschutzadditive	10% (v/v) DMSO	6% (v/v) DMSO + 6% (v/v) Ethylenglykol + 0,15M Saccharose
Sättigungsschritt	Nein	Ja, mit 50% (v/v) Ethylenglykol + 10% (v/v) SSS + DPBS
Hinzugabe des Gefrierschutzadditivs	Möglichst schnell	<i>Dropping Methode</i>
Kühlrate	Langsames Einfrieren, ca. -1°C/min	Variiert im Laufe des Kühlprogramms; insgesamt höhere Kühlrate
Temperatur, ab welcher die Zellen in Flüssigstickstoff gelagert werden	-80°C	-34°C
Automatisierte Einfriermaschinen	Nein	Ja (IceCube 14S)
Zugabe von DMSO	Bei Raumtemperatur	Bei 0-4°C
Automatisierte Eisbildung ( <i>Autoseeding</i> )	Nein	Ja (für 10 Minuten bei -6°C)

Auftautemperatur	37°C	100°C bei ovariellm Gewebe
Inkubation mit Saccharose-haltigem Auftaumedium	Nein	Ja (mittels <i>dropping</i> Methode und anschließender Inkubation für 7 Minuten bei 3D-Aggregaten)
Rehydrierung mit Kulturmedium	Tröpfchenweise, jedoch schneller	<i>Dropping</i> Methode bei 3D-Aggregaten

Tabelle 2: Vergleich zwischen dem etablierten Protokoll und dem Protokoll aus der Gynäkologie

Der Vergleich beider Protokolle illustriert, dass sich beide Methoden im grundlegenden Ablauf ähneln, sich jedoch bei näherer Betrachtung unterscheiden.

Beide Protokolle haben den Erhalt einer hohen Zellüberlebensrate nach der Kryokonservierung als Ziel. Die Reproduktionsmedizin verzeichnet hier relativ große Erfolge, zumal durch die Kryokonservierung von ganzem ovariellen Gewebe hohe Quantitäten an Zellen in einem dreidimensionalen Aggregat kryokonserviert werden können.<sup>154</sup>

Folglich stellt sich die Frage, ob das Protokoll zur Kryokonservierung von ovariellm Gewebe auch für die Kryokonservierung von hiPSCs geeignet ist.

## 2.5. Fragestellungen und Ziel der Doktorarbeit- Das *optimale* Protokoll

Damit dem Ziel der Etablierung eines skalierbaren Verfahrens nähergekommen wird, wurden Zellsphäroide (*embryoid bodies*), welche aus hiPSCs generiert worden waren, kryokonserviert. Die Zellsphäroide sollen idealerweise nach der Kryokonservierung zur Beladung eines Bioreaktors genutzt werden. Dabei erhofften wir uns, ein Verfahren zu etablieren, mit dem sich undifferenzierte *embryoid bodies* aus hiPSC in großer Dichte kryokonservieren lassen, sodass Ausgangsmaterial für die Beladung von Bioreaktoren zur Zelldifferenzierung produziert werden kann. Die Etablierung eines skalierbaren Verfahrens ist wichtig, da die klinische Implementierung der Zelltherapie eine hohe Zellzahl erfordert.

Dies kann durch das Beispiel der Zelltherapie beim Myokardinfarkt im Schweinemodell verdeutlicht werden, bei der schätzungsweise  $10^9$  -  $10^{10}$  PSC-CMs zur Injektion benötigt werden.<sup>155</sup> Die optimale Kryokonservierung der hiPSCs stellt ein wichtiges Kriterium zur Etablierung einer skalierbaren Zelltherapie dar.

Aufgrund der Tatsache, dass die Kryokonservierung aus mehreren Teilschritten besteht, wurde durch Etablierung verschiedener Gruppen versucht, die Kryokonservierung von hiPSCs durch Untersuchung verschiedener Aspekte systematisch zu evaluieren.

Zum einen soll am Ende dieser Doktorarbeit die Kryokonservierung von hiPSCs in Zellclustern versus als Einzelzellsuspension bewertet werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Probleme bei der Kryokonservierung komplexer Systeme (siehe 2.3.8) wurde erwartet, dass hiPSCs als Einzelzellen die Kryokonservierung unabhängig vom verwendeten Protokoll besser überleben.

Außerdem sollte die Anwendung der Methodik der Kryokonservierung aus der gynäkologischen Klinik auf die hiPSCs untersucht werden. Dafür stellten wir die Hypothese auf, dass Kenntnisse bei der Kryokonservierung von ovariellen Geweben auf Stammzellen übertragbar seien. Folglich erhofften wir uns, dass die Überlebensraten der hiPSCs-Aggregate bei der Kryokonservierung mit dem gynäkologischen Protokoll höher seien als mit dem etablierten Protokoll, da das gynäkologische Protokoll auf die Kryokonservierung komplexerer Systeme angepasst wurde. Für Einzelzellen hingegen bestand die Annahme, dass das etablierte Protokoll zu höheren Überlebensraten führen würde, da das etablierte Protokoll bereits auf die Kryokonservierung von hiPSCs als Einzelzellen angepasst wurde.

Des Weiteren sollten zwei verschiedene Einfriermedien miteinander verglichen werden. Da das Medium aus der Gynäkologie auf ovarielles Gewebe angepasst worden war, bestand die Annahme, dass das Einfriermedium aus dem etablierten Protokoll für die Kryokonservierung von hiPSCs geeigneter sei.

Überdies wurde die Auftautemperatur von 37°C mit jener bei 100°C verglichen. Eine hohe Auftautemperatur kann die Zeit des Auftauens verkürzen. Nichtsdestotrotz erwarteten wir, dass die Auftautemperatur von 100°C für Stammzellen zu hoch sei, da ein zytotoxischer Effekt einer zu hohen Temperatur bereits für mesenchymale Stammzellen gezeigt werden konnte.<sup>156</sup>

Durch den Vergleich der enzymatischen Dissoziation mit Trypsin versus der mechanischen Dissoziation mit einem Zellstrainer sollte untersucht werden, inwiefern die Art der Dissoziation in Kombination mit der Kryokonservierung einen Einfluss auf das Überleben von hiPSCs-Aggregaten hatte. Es bestand die Hypothese, dass die mechanische Dissoziation geeigneter für 3D-Aggregate sei, da ein zytotoxischer Effekt der Trypsinierung bereits bekannt ist.<sup>157</sup>

Überdies wurde für die enzymatische Dissoziation eine Positivkontrolle durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Trypsinierung auf das Zellüberleben von hiPSCs-Aggregaten untersucht, welche nicht kryokonserviert wurden.

Auch für den Transport der Zellen in das gynäkologische Labor wurde eine Positivkontrolle durchgeführt. Es wurde erwartet, dass der Transport aufgrund der geringen Transportzeit keinen Einfluss auf das Zellüberleben hatte.

Überdies galt es durch den systematischen Vergleich herauszufinden, welche Zwischenschritte und daraus resultierende biochemische Pathomechanismen zur



Erniedrigung der Überlebensraten identifiziert werden können, um so eine Basis für eine Optimierung des bestehenden Kryokonservierungsprotokolls zu schaffen.

Hier liegt das größte Risiko dieser experimentellen Doktorarbeit, da bisher noch kein Labor einen solchen Erfolg verzeichnen konnte und das in der Reproduktionsmedizin angewandte Verfahren noch nicht auf humane Stammzellen angewandt wurde. Eine optimale Kryokonservierung der hiPSCs kann jedoch als Voraussetzung zur idealen Lagerung von Stammzellen betrachtet werden, um so dem Ziel eines bioartifiziellen Herzgewebes einen Schritt näherzukommen.

Zusammenfassend soll im Rahmen des Projektes ein weiterer Schritt in Richtung eines optimierten Kryokonservierungsverfahrens für große Zahlen an humanen pluripotenten Stammzellen entwickelt werden, das die Produktion klinisch relevanter Zahlen Stammzell-abgeleiteter Zellen in biotechnologischen Verfahren erleichtert.

Das generische Maskulinum, das in dieser Doktorarbeit gewählt wurde, bezieht sich sowohl auf die männliche, als auch auf die weibliche und andere Formen der Geschlechteridentitäten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Equipment

Name	Unternehmen
Cellometer® Vision CBA	Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA)
CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Kryogener Lagerbehälter CryoCe10XTB-11	Worthington Cylinders GmbH (Columbus, USA)
KS 260 Basic Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
Neubauer Häemocytometer Kammer	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Nikon Eclipse Ts2 Mikroskop	Nikon Corporation (Tokyo, JP)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH (Wertheim, DE)
Pipette Discovery Comfort 10µL	Corning HTL SA (Warschau, POL)
Pipette Discovery Comfort 100µL	Corning HTL SA (Warschau, POL)
Pipette Discovery Comfort 1000µL	Corning HTL SA (Warschau, POL)
Rotofix 32A Tischzentrifuge 1205	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, DE)
Schüttelinkubator Multitron	Infors HAT (Reigate, UK)
Sicherheitswerkbank Herasafe™ Steril	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sicherheitswerkbank Heraeus LaminAir HB 2448	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SY-LAB IceCube 14S	Sy-Lab (Neupurkersdorf, AUT)
Thermo IEC Centra CL2 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ultratiefkühlschrank Serie 900	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Wasserbad GP 20-20 L	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zeiss Axiovert 25 inverses Mikroskop mit Phasenkontrast	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)
Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)

Tabelle 3: Equipment

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

Name	Katalognummer	Unternehmen
6 Well Zellkultur Multiwellplatte	657160	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Adhäsive Objektträger 76x76x1mm	0810000	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, DE)
Deckgläser 24x50mm	7695030	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
EASYstrainer™ 40 µm	542040	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Falcon Probenbehälter 110mL	354014	Falcon (Le Pont de Claix, FR)
Glas Mikroskop-Objektträger	K0124b	Engelbrecht GmbH (Edermünde, DE)
Nalgene™ Kryoröhrchen 5mL	5000-0050	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nunc™ Kryoröhrchen 1,8mL	375418	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pasteur-Pipetten Glas 230mm	612-1701	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Petrischale 94x16mm mit Nocken	633180	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Plastik Pipette, 5mL	606180	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Plastik Pipette, 10mL	607180	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Plastik Pipette, 25mL	760180	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Plastik Pipette, 50mL	768180	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitzen 10µL	70.3010.205	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 100µL	70.760.002	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)

Pipettenspitzen 1000µL	70.762	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Reagiergefäß 1,5mL	72.690.001	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Röhrchen, 15mL	188271	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Röhrchen, 50ml	227261	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Spritze PlastiPak™	303172	BD Medical (Heidelberg, DE)
Sterifix® Injektionsfilter 0,2µm	4099206	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Telaprep® Präpariertupfer	4501000	Hartmann AG (Heidenheim, DE)
Zellkulturschale 35x10mm	353001	Falcon (New Jersey, USA)
Zellkulturschale 60x15mm	353002	Falcon (New Jersey, USA)
Zellkulturschale 100x20mm	83.3902	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Zellschaber 28cm lang	541070	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, DE)
Zählkammer Cellometer®	E63561-100	Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA)

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

### 3.1.3. Zelllinien

Zelllinien-Typ	Quelle des Zelltyps	Zelllinien-Name
hiPSCs	Fibroblasten der Dermis (Haut)	NP0040-8

Tabelle 5: Zelllinien

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Saric (Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Weitere Informationen können auf <https://hpscereg.eu/cell-line/UKKi011-A> gefunden werden. Für die anonymisierte bzw. pseudonymisierte und freiwillige Spende des Primärgewebes sowie für die Generierung und Weitergabe der hiPSCs wurden von der EBiSC standardisierte Einverständniserklärungen entwickelt und eingeholt. Eine detaillierte Darstellung zur Einwilligungserklärung und der Beschaffung des Primärgewebes kann auf

<https://ebisc.org/customer-information/consent-primary-tissue-procurement> eingesehen werden.

### 3.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Name	Katalognummer	Unternehmen
bFGF (Rekombinantes Human FGF-basic)	100-18B	Pepro Tech (New Jersey, USA)
Calcein AM	C1430	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DMEM/F-12 (1:1) (1x) <sup>+</sup> GlutamMAX™	31331-0228	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DMSO	M6323.0100	Genaxxon bioscience, GmbH (Ulm, DE)
DPBS	14190-094	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
EDTA	E-4884-100G	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol	2248-5L	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Ethidium Homodimer 1	E1169	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethylenglykol	324558	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
FBS	F9665	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
FCS	C8056	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Flüssigstickstoff	78400571	Cryotherm GmbH & Co. KG (Kirchen, DE)
Flüssigstickstoff Cryospeed®Med	231-783-9	Linde Gas Therapeutics GmbH (Unterschleißheim, DE)
Heparin Natriumsalz	H3149-10KU	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Immersol™ 518F	090428	Carl Zeiss, AG (Oberkochen, DE)
Insulin Humalog	VL7510	Lilly Deutschland GmbH (Bad Homburg, DE)
L-15- Medium mit Glutamin	L1518	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
L-Ascorbinsäurephosphat Magnesiumsalz-N-Hydrat	013-12061	Wako Chemicals Europe GmbH (Neuss, DE)
L-Glutamin	A2916801	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Matrigel Matrix	734-1440	Corning Life Sciences (New York, USA)
Natriumselenit	S5261	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Nicht essentielle Aminosäuren	11140-035	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ReleSR™	05872	Stemcell technologies (Vancouver, CA)
Rho kinase (ROCK) Inhibitor Y27632	A11001-5	Adooq Bioscience LLC (California, USA)
Saccharose 0,15M	S5016	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Saccharose 0,5M	1.07653	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Serum Substitute Supplement (SSS)	99193	Irvine Scientific (Santa Ana, USA)
TGF (Rekombinantes Humanes TGF-β1)	100-21	PeptoTech (New Jersey, USA)
Trypanblau 0,4%	15250-061	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypsin-EDTA 0,05%	25300-054	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

### 3.1.5. Puffer, Lösungen und Medium

Name	Zusammensetzung
Auftaumedium (Gynäkologie)	E8-haltiges Medium; 0,5M Saccharose
Einfriermedium (2x Medium zur Verdünnung mit Zellkulturmedium in gleichen Teilen, etabliertes Protokoll)	20% (v/v) DMSO, 80% (v/v) FBS
Einfriermedium (Gynäkologie)	DPBS, 6% (v/v) DMSO, 6% (v/v) Ethylenglykol; 0,15M Saccharose
Färbelösung	1mL PBS, 2µL Ethidium Homodimer-1; 0,5µL Calcein AM
FBS Lösung	20% (v/v) FBS, 80% (v/v) DMEM/F12
hiPSCs E8 Medium	DMEM/F12, 20µg mL <sup>-1</sup> Insulin, 5µg mL <sup>-1</sup> Transferrin, 14ng mL <sup>-1</sup> Natriumselenit, 100ng mL <sup>-1</sup> Heparin Natriumsalz, 64µg mL <sup>-1</sup> L-Ascorbinsäurephosphat Magnesiumsalz-n-hydrat, 1 U mL <sup>-1</sup> P/S, 2mM L-Glutamin, 100ng mL <sup>-1</sup> bFGF, 2ng mL <sup>-1</sup> TGF, 5µM ROCK Inhibitor
Matrigellösung	DMEM/F12, 10µg cm <sup>-2</sup> Matrigel
Sättigungslösung (Gynäkologie)	40% (v/v) Ethylenglykol, 10% (v/v) SSS, DPBS

Tabelle 7: Puffer, Lösungen und Medium

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zusammenfassung der methodischen Herangehensweise

Um die Qualität der Kryokonservierung zu evaluieren, wurden mehrere Parameter berücksichtigt. Neben verschiedenen Zellüberlebensraten (siehe 3.2.15) wurden die Proliferationsrate und der Durchmesser der Zellen bestimmt. Ein veränderter Durchmesser kann eine gestörte Plasmamembranintegrität implizieren und gilt folglich als Indikator für Apoptose.<sup>158</sup> Um einen groben Einblick in den Differenzierungsstatus der Zellen zu erlangen, wurden einzelne Zellen morphologisch evaluiert. Auf diese Weise ließ sich eine differenzierte Betrachtung des Effekts der Kryokonservierung feststellen.

Um nicht nur den kurzfristigen Effekt der Kryokonservierung zu betrachten, wurden die Zellen auf die bereits genannten Parameter 24h nach dem Auftauen und Kulturen analysiert.

Demnach konnte zusätzlich das Proliferations- und Anheftungsverhalten der Zellen nach dem Auftauen bewertet werden.

Insgesamt wurden elf unterschiedliche Gruppen miteinander verglichen. Dabei sollten nicht nur die Kryokonservierung, sondern auch der Effekt der enzymatischen Dissoziation durch Trypsin sowie der mechanischen Dissoziation durch Zellfiltration evaluiert werden. Ferner wurden zwei verschiedene Einfriermedien und zwei verschiedene Auftautemperaturen miteinander verglichen. Ebenso wurde ein potenzieller Effekt des Transports der hiPSCs in das gynäkologische Labor bewertet.

Da im Folgenden unterschiedliche Gruppen erwähnt werden, wurde eine Übersicht zur besseren Unterscheidung der Gruppen erstellt. Diese Übersicht zeigt die Abbildung 6:

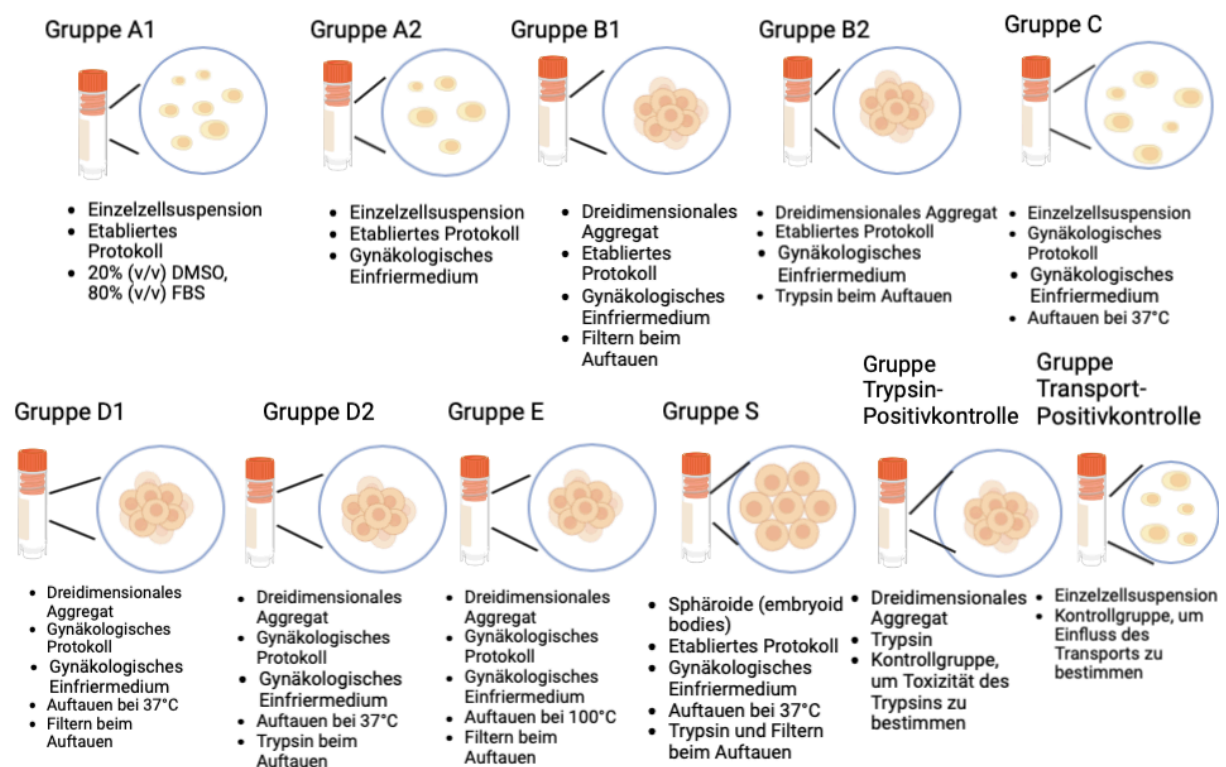


Abbildung 6: Gruppeneinteilung der Experimente

Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

**Gruppe A1:** Hierbei handelte es sich um eine Einzelzellsuspension im Gefrier Röhrchen, welche nach dem etablierten Protokoll eingefroren wurde. Als Gefrierschutzmittel wurden 20% (v/v) DMSO und 80% (v/v) FBS verwendet, wobei dieses mit dem E8 Medium im Verhältnis 1:1 gemischt wurde. Die Endkonzentration des Dimethylsulfoxids im Kryoröhrchen betrug 10%.

**Gruppe A2:** Hierbei handelte es sich um eine Einzelzellsuspension im Gefrier Röhrchen, welche nach dem etablierten Protokoll eingefroren wurde. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet.

**Gruppe B1:** Hierbei handelte es sich um ein dreidimensionales Aggregat im Gefrier Röhrchen, welches nach dem etablierten Protokoll wurde. Es wurde ein Einfriermedium aus der



Gynäkologie verwendet. Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut. Beim Auftauen wurden die Zellen mit einem 40µm Zellstrainer filtriert.

Gruppe B2: Hierbei handelte es sich um ein dreidimensionales Aggregat im Gefrier Röhrchen, welches nach dem etablierten Protokoll eingefroren wurde. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet. Beim Auftauen wurden die Zellen mit Trypsin behandelt.

Gruppe C: Hierbei handelte es sich um eine Einzelzellsuspension im Gefrier Röhrchen, welche nach dem Protokoll aus der Gynäkologie eingefroren wurde. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet.

Gruppe D1: Hierbei handelte es sich um ein dreidimensionales Aggregat im Gefrier Röhrchen, welches nach dem Protokoll aus der Gynäkologie eingefroren wurde. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet. Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut. Beim Auftauen wurden die Zellen mit einem 40µm Zellstrainer filtriert.

Gruppe D2: Hierbei handelte es sich um ein dreidimensionales Aggregat im Gefrier Röhrchen, welches nach dem Protokoll aus der Gynäkologie eingefroren wurde. Die eingefrorenen Zellen werden bei 37°C aufgetaut. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet. Beim Auftauen wurden die Zellen mit Trypsin behandelt.

Gruppe E: Hierbei handelte es sich um ein dreidimensionales Aggregat im Gefrier Röhrchen, welches nach dem Protokoll aus der Gynäkologie eingefroren wurde. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet. Die Zellen wurden bei 100°C aufgetaut. Beim Auftauen wurden die Zellen mit einem 40µm Zellstrainer filtriert.

Gruppe S: Hierbei handelte es sich um Sphäroide (embryoid bodies) im Gefrier Röhrchen, welche nach dem etablierten Protokoll eingefroren wurden. Es wurde ein Einfriermedium aus der Gynäkologie verwendet. Beim Auftauen werden die Zellen mit einem 40µm Zellstrainer filtriert und mit Trypsin behandelt.

Gruppe Trypsin-Positivkontrolle: Hierbei handelte es sich um ein dreidimensionales Aggregat, welches als positive Kontrollgruppe für die Trypsinierung fungierte. Die Zellen wurden nicht eingefroren, sondern lediglich mit Trypsin behandelt. So konnte die Toxizität des Trypsins auf die Zellen bestimmt werden.

Gruppe Transport-Positivkontrolle: Hierbei handelte es sich um eine Einzelzellsuspension, welche als positive Kontrollgruppe für den Transport fungierte. Die Zellen wurden nicht eingefroren, sondern lediglich in die gynäkologische Fakultät gebracht. So konnte der Einfluss des Transports auf das Zellüberleben bestimmt werden.

Einzelne Gruppen wurden paarweise miteinander verglichen. Die paarweisen Vergleiche wurden in Obergruppen zusammengefasst, damit einzelne Parameter der Kryokonservierung betrachtet werden können. Einen ausführlicheren Überblick über die Gruppenvergleiche und welche Parameter daraus untersucht werden können zeigt die Tabelle 8:

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Zu untersuchende Parameter bei der Kryokonservierung</b>
A1, A2, C vs. B1, B2, D1, D2, E	Einzelzellen vs. 3D-Aggregate
A1, A2 vs. C	Einzelzellen nach etabliertem Protokoll vs. Einzelzellen nach gynäkologischem Protokoll
B1, B2 vs. D1, D2	3D-Aggregate nach etabliertem Protokoll vs. 3D-Aggregate nach gynäkologischem Protokoll
B1, D1 vs. B2, D2	Mechanische Dissoziation vs. Enzymatische Dissoziation
A1 vs. A2	Vergleich zweier Einfriermedien
D1 vs. E	Vergleich zweier Auftautemperaturen

*Tabelle 8: Gruppenvergleiche und zugehörige Parameter, die bei der Kryokonservierung untersucht wurden*

*Der Vergleich der Gruppen A1, A2 und C mit den Gruppen B1, B2, D1, D2 und E erlaubte es, die Kryokonservierung von Einzelzellen mit jener von 3D-Aggregaten unabhängig vom verwendeten Protokoll zu vergleichen. Wurden die Gruppen A1 und A2 mit der Gruppe C verglichen, so wurden die Kryokonservierung von Einzelzellen nach dem etablierten Protokoll und die Kryokonservierung von Einzelzellen nach dem gynäkologischen Protokoll gegenübergestellt. Analog dazu erlaubte der Vergleich der Gruppen B1 und B2 mit den Gruppen D1 und D2 dies für 3D-Aggregate. Wurden die Gruppen B1 und D1 mit den Gruppen B2 und D2 verglichen, so wurde die mechanische Dissoziation der enzymatischen Dissoziation der Zellen gegenübergestellt. Der Vergleich zweier Einfriermedien erfolgte über den Vergleich zwischen den Gruppen A1 und A2. Ein Gegenüberstellen der Gruppe D1 und E erlaubte den Vergleich zweier Auftautemperaturen.*

Die Abbildungen zu den Überlebensraten der verschiedenen Gruppen (siehe Abbildungen 11-16) sowie die Abbildung zu den Durchmessern der Sphäroide (siehe Abbildung 24) wurden mit Microsoft Excel erstellt. Die Darstellung der Proliferationsrate (siehe Abbildung 17) sowie die Abbildungen der Überprüfung der Voraussetzungen (siehe Abbildungen 21-23) wurden mit SPSS generiert.

Bei der Verteilung der Durchmesser unterschiedlicher Gruppen handelt es sich um Histogramme, die vom Cellometer® erstellt wurden (siehe Abbildungen 18-20). Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen wurden vom Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop generiert (siehe Abbildungen 25 und 26). Die Erstellung der Sphäroid-Aufnahmen erfolgte mithilfe des Nikon Eclipse Ts2 Mikroskops (siehe Abbildung 27). Bei den

Abbildungen 9 und 10 handelt es sich um eigene Fotoaufnahmen, welche mithilfe von Biorender.com bearbeitet wurden. Alle Abbildungen, die mit Biorender.com kreiert wurden, wurden durch einen entsprechenden Zusatz unterhalb der Abbildung gekennzeichnet.

Als Zitierprogramm wurde EndNote 21 benutzt.

### **3.2.2. Humane induzierte-pluripotente Stammzellen Kultur und Subkultivierung**

Die hiPSCs-Zelllinie NP0040-8 wurde permanent in Kultur genommen. Die human induzierten-pluripotenten Stammzellen wurden ab einer Konfluenz von 70-90% subkultiviert. Eine optische Kontrolle der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch (Zeiss Axiovert 25 inverses Mikroskop mit Phasenkontrast).

Die Kultur der Zellen erfolgte auf Matrigel-beschichteten 10cm Petrischalen, um eine Adhäsion der hiPSC Zellen zu gewährleisten. Für die Matrigel-Beschichtung wurden die Platten für mindestens eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. Das E8 Medium wurde bei 37°C für 15 Minuten im Wasserbad erwärmt. Die Matrigellösung wurde abgesaugt und 10mL E8 Medium wurden pro Platte vorgelegt. Zur Platte wurden 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF hinzugefügt. Eine andere Petrischale, auf der sich bereits die hiPSCs Kultur befand, wurde aus dem Inkubator entnommen. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurde das E8 Medium abgesaugt. Zur Ablösung der hiPSCs wurden 2mL ReleSR zur Petrischale hinzugefügt. Für das Subkultivieren von Zellclustern betrug die Inkubationszeit bei Raumtemperatur eine Minute. Nach Absaugen der ReleSR-Lösung erfolgte zur vollständigen Ablösung eine Inkubation der Zellen mit der restlichen ReleSR-Lösung für zwei Minuten. Das E8 Medium wurde halbmondförmig auf die Petrischale gegeben. Unter geringem Druck erfolgte eine Resuspension der abgelösten Zellen.

Aus der Zellsuspension wurden in Abhängigkeit von der benötigten Zelldichte 50-200µL auf die neue Petrischale subkultiviert. Bei Beginn einer neuen Experimentreihe wurden die Zellen gemäß dem unten genannten Protokoll ausgezählt (siehe 3.2.4), um eine standardisierte Anzahl an Zellen auf die neue Petrischale zu geben.

Der grobe Versuchsplan ist in Abbildung 7 dargestellt:

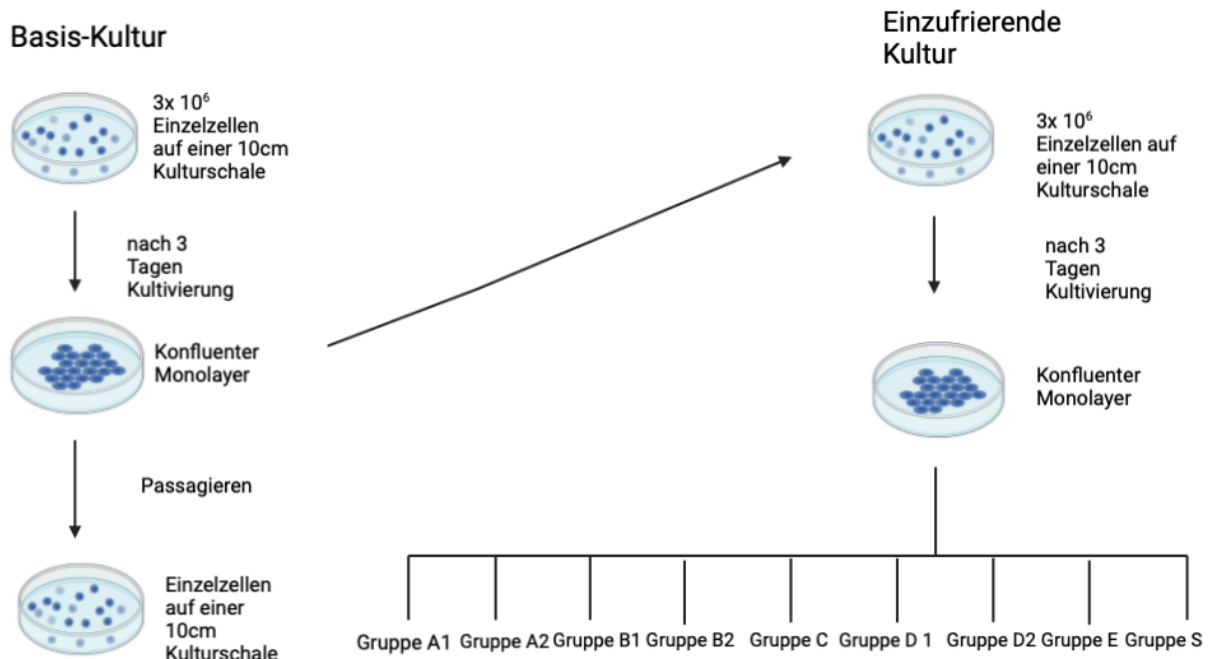


Abbildung 7: Grober Versuchsplan

Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

Dargestellt wird der grobe Versuchsplan, der sich in eine Basis-Kultur und eine einzufrierende Kultur unterteilen lässt. Die Basis-Kultur diente der Generierung von Zellen für weitere Experimente. Die einzufrierende Kultur wurde für die Kryokonservierung verwendet. Es wurde ein Standard von  $3 \times 10^6$  ausplattierten Einzelzellen auf einer 10cm Kulturschale ( $58,1\text{cm}^2$ ) festgesetzt, da diese eine Konfluenz von 70-90% nach dreitägiger Inkubation aufwiesen.

Beide Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Täglich erfolgten der Wechsel des hiPSCs E8 Mediums und lichtmikroskopische Kontrollen.

### 3.2.3. Generierung von Einzelzellen aus einem Monolayer

Zur Generierung von Einzelzellen aus einem Monolayer wurde das E8 Medium abgesaugt und mit 5mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und es wurden 2mL ReleSR in die Petrischale gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für sieben Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die hiPSCs wurden mit E8 Medium durch halbmondförmige Zugabe und unter leichtem Druck resuspendiert.

Die Suspensionslösung wurde durch einen 40µm Strainer tröpfchenweise gefiltert und in einem mit E8 Medium befüllten 50mL Röhrchen aufgefangen. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 15mL Röhrchen wurde dieses für zwei Minuten bei 1000rpm

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und eine Resuspension mit E8 Medium erfolgte in Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets.

Die Zellzahl und die Zellviabilität wurden mit Trypanblau überprüft.

Die Trypanblau-Methode gilt in Laboren als ein Standardverfahren zur einfachen Bestimmung der Viabilität von Zellen. Dabei wird die Membranintegrität der Zelle überprüft. Zellen mit einer geschädigten Membran werden dunkelblau angefärbt, wohingegen Zellen mit intakter Membran nicht angefärbt werden und unter dem Lichtmikroskop weiß erscheinen.<sup>159</sup>

Es wurden 20µL aus der Zellsuspension mit 20µL Trypanblau resuspendiert. Aus dieser Lösung wurden 20µL auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und die Zellen wurden ausgezählt. Dies wurde schematisch in Abbildung 8 zusammengefasst:

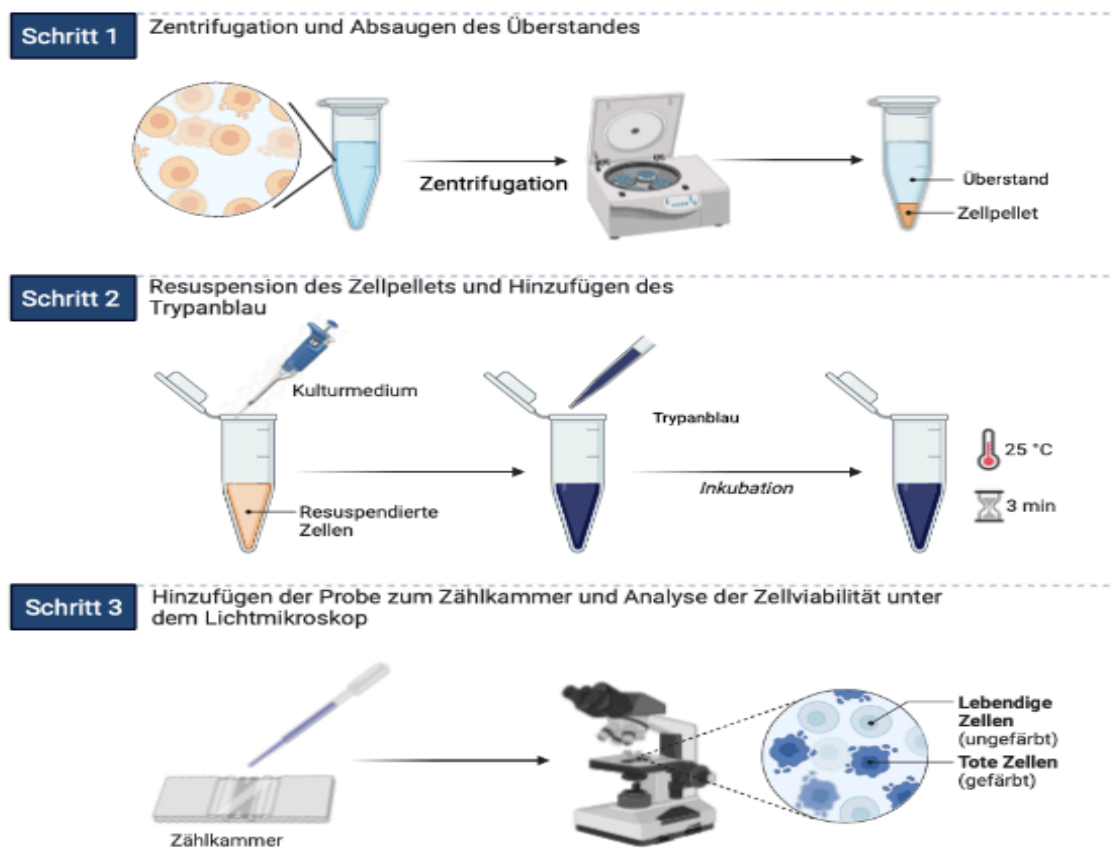


Abbildung 8: Ablauf der Behandlung der Zellen mit Trypanblau

Die Abbildung wurde von „Cell Viability Assay (Trypan Blue)“ von Biorender.com (2022) angepasst. <https://app.biorender.com/biorender-templates> (zuletzt abgerufen am 10.12.2022).

Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

Die Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert. Nach Zugabe von Trypanblau wurde die Lösung für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine Auszählung der Zellen mit einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop.

Die Ergebnisse aus dem gezählten Volumen wurden auf das Gesamtvolumen der Ausgangssuspension hochgerechnet. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte unter Anwendung der Formeln für die jeweiligen Überlebensraten auf Basis dieser hochgerechneten Zellzahlen (siehe 3.2.15).

Die erforderliche Menge der zu entnehmenden Zellsuspension ( $3 \times 10^6$  Einzelzellen) wurde berechnet und auf eine neue 10cm Petrischale pipettiert, in welcher sich 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF, 100µL bFGF und 10mL E8 Medium befanden. Der Medienwechsel sowie die Zugabe von 10µL TGF und 100µL bFGF erfolgten täglich. Nach drei Tagen wurde eine Konfluenz von 70-90% erreicht. Abhängig davon, ob Einzelzellen oder dreidimensionale Aggregate eingefroren werden sollten, wurde das Protokoll zur Generierung von Einzelzellen wiederholt bzw. das Protokoll zum Einfrieren von dreidimensionalen Aggregaten angewandt (siehe 3.2.6).

#### **3.2.4. Bestimmung der Zellviabilität**

Vor jedem Einfrierprozess wurde die Zellviabilität überprüft (=T0). Um Zellen anzufärben und die Zellviabilität bewerten zu können, mussten aus dem konfluenten Monolayer Einzelzellen erzeugt werden (siehe 3.2.3). Zellen im dreidimensionalen Aggregat ließen sich nicht vollständig anfärben, sodass die 3D-Aggregate in Einzelzellen überführt werden mussten. Zur Bestimmung der Überlebensraten der 3D-Aggregate wurden bei jedem Durchlauf eigene Platten generiert.

Um die Zellviabilität zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Bei der ersten Methode wurde Trypanblau verwendet (siehe 3.2.3). Bei der zweiten Methode wurde ein Färbekit angewandt. Es wurden 1mL PBS mit 2µL Ethidium Homodimer-1 und 0,5µL Calcein AM vermischt. Aufgrund potenzieller phototoxischer Effekte wurde die Färbelösung unter Lichtverschluss gelagert. 100µL der Zellsuspension wurden mit 100µL der Färbelösung vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Die Zellsuspension wurde mit dem Cellometer® und dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenz-Mikroskop) analysiert. Das Fluoreszenz-Mikroskop wurde zur Analyse der Morphologie der Einzelzellen und 3D-Aggregate benutzt. Bei dem Cellometer® handelt es sich um ein Gerät, das die manuelle Zählkammer ersetzt und bestimmte Parameter, unter anderem die Zellviabilität, mittels Detektion der Fluoreszenz bestimmt. Vitale Zellen stellten sich grün dar und tote Zellen rot. Da es sich bei dem Cellometer® um ein in dem Labor noch nicht etabliertes Verfahren handelte, wurde zur Kontrolle weiterhin die Zellviabilität durch die Neubauer Zählkammer mittels der Trypanblau Methode bestimmt. Folglich beziehen sich die Angaben der berechneten Parameter (siehe 3.2.15) auf die Auszählung mit Trypanblau. Einzig die Werte der Zelldurchmesser wurden aus dem Cellometer entnommen.

Ausgenommen davon sind die Durchmesser der Sphäroide, welche separat ausgemessen wurden (siehe 3.2.14).

Falls vom Cellometer® zu wenig Zellen detektiert wurden, erfolgte eine Zentrifugation der Probe bei 1000rpm für zwei Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen erneut mit der Färbelösung resuspendiert. Die Resuspension der Zellen erfolgte in Abhängigkeit von der Größe des Zellpellets. Bei den vom Cellometer generierten Abbildungen zu den Durchmessern wurden die Zellzahlen auf der Ordinatenachse nicht zu stark miteinander verglichen, da aufgrund der unterschiedlich ausfallenden Zellpelletgröße und der damit verbundenen, subjektiven Bewertung der Menge an Resuspensionslösung kein standardisiertes Volumen der Färbelösung gewählt wurde (siehe 4.9.1). Entsprechend sollten die Histogrammvergleiche mit Zurückhaltung interpretiert werden. Des Weiteren erlaubten die Abbildungen des Cellometers keinen zu starken Rückschluss auf die Zellüberlebensraten, da diese bereits unter standardisierten Bedingungen bestimmt wurden (siehe oben).

Eine fotografische Darstellung des Cellometers® zeigt die Abbildung 9:



Abbildung 9: Darstellung des Cellometers®

*Aus der Lösung mit den angefärbten Zellen wurden nach 30-minütiger Inkubation 20µL der Lösung entnommen und auf eine Zählkammer platziert. Diese wurde anschließend in die Maschine gegeben, sodass eine Analyse der Verteilung der Zelldurchmesser erfolgen konnte.*

### **3.2.5. Einfrieren der Einzelzellen nach etabliertem Protokoll**

Bei dem hier beschriebenen Protokoll handelte es sich um ein bereits etabliertes Verfahren, wohingegen alle anderen Verfahren durch mehrfache Wiederholung etabliert werden mussten.

Nach Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen bei 1000rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet der Gruppe A1 wurde mit 0,9mL des E8 Mediums resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein 1,8mL Kryoröhrchen gegeben. Aus dem Einfriermedium wurden 0,9mL entnommen und in das Kryoröhrchen gegeben. Die Endkonzentration von DMSO im Kryoröhrchen betrug 10% (v/v).

Für die Gruppe A2 erfolgte nach Bestimmung der Zellviabilität eine Zentrifugation bei 1000rpm für zwei Minuten. Das Zellpellet wurde mit 1,8mL des Einfriermediums aus der Gynäkologie resuspendiert (siehe Tabelle 7). Die Lösung wurde in ein 1,8mL Kryoröhrchen transferiert. Die Endkonzentration der Gefrierschutzmittel im Kryoröhrchen der Gruppe A2 (und aller anderen Gruppen bis auf Gruppe A1) betrug 6% (v/v) DMSO, 6% (v/v) Ethylenglykol und 0,15M Saccharose.

Die Kryoröhrchen wurden schnellstmöglich in einem Gefrierschrank in einem Isopropanol Behälter bei -80°C gelagert. Die Einfrierrate betrug annähernd -1°C/min (Gruppen A1 und A2).

### **3.2.6. Einfrieren der dreidimensionalen Aggregate nach etabliertem Protokoll**

Aus der Petrischale wurde das Medium abgesaugt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen spiralförmig abgetragen und das entstandene dreidimensionale Aggregat wurde in ein 1,8mL Kryoröhrchen platziert, in welchem sich bereits 1,8mL des Einfriermediums befanden. Das Gemisch wurde mit leichtem Druck resuspendiert. Das Kryoröhrchen wurde schnellstmöglich in einem Gefrierschrank in einem Isopropanol Behälter bei -80°C gelagert. Die Einfrierrate betrug annähernd -1°C/min (Gruppen B1 und B2).

### **3.2.7. Auftauprozess von Einzelzellen**

Alle Gruppen wurden standardisiert nach einer Woche der Kryokonservierung aufgetaut. Der Auftauprozess gemäß dem etablierten Protokoll war insgesamt kürzer. Eine 10cm große Petrischale mit 5mL Matrigel wurde für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach Absaugen des Matrigels wurde die Platte mit 10mL E8 Medium, 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF bedeckt. Das Kryoröhrchen wurde aus dem Gefrierschrank entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C gelagert, bis sich optisch eine homogene Lösung ohne Eiskristalle bildete. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde Tropfen für Tropfen in ein 15mL Röhrchen mit bereits enthaltenem E8 Medium gegeben. Das Gefäß wurde für vier Minuten bei 1000rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Eine Resuspension des Zellpellets mit dem Kulturmedium erfolgte. Ein Teil der Zellsuspension wurde für die Analysen mit der Neubauer Zählkammer, dem Cellometer® und dem Fluoreszenzmikroskop benutzt (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Dadurch konnte der direkte Effekt der Kryokonservierung ermittelt werden (=T1). Die



restliche Zellsuspension wurde für 24h in Kultur genommen. Die Zellsuspension wurde auf die vorbereitete Petrischale mit 10mL Kulturmedium, 10µL ROCK-Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF pipettiert und in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert (siehe 3.2.2) (Gruppen A1 und A2).

### **3.2.8. Auftauprozess von dreidimensionalen Aggregaten mittels Filterung**

Eine Petrischale wurde für mindestens eine Stunde mit 5mL Matrigellösung inkubiert. Nach dem Absaugen der Matrigellösung wurde die Platte mit 10mL E8 Medium bedeckt. Zur Platte wurden 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF gegeben. Das Kryoröhrchen wurde aus dem Gefrierschrank entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C gelagert, bis optisch keine Eiskristalle mehr sichtbar waren. In ein 15mL Röhrchen, welches mit E8 Medium befüllt worden war, wurde der Inhalt des Kryoröhrchens Tropfen für Tropfen transferiert. Das Gemisch wurde bei 1000rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Auf das Zellpellet wurde 1mL PBS gegeben und nach der Resuspension wurde die Lösung erneut bei 1000rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension mit E8 Medium wurde ein 40µm Strainer auf ein 50mL Röhrchen platziert und die Zellsuspension wurde auf den Strainer gegeben. Nach mehrmaligem Filtern mit Kulturmedium wurde die Zellsuspension in ein 15mL Röhrchen überführt. Bei 1000rpm wurde die Lösung für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit E8 Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde für die direkte Analyse extrahiert (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Die restliche Zellsuspension wurde auf die vorbereitete Petrischale transferiert und für 24h in Kultur genommen (siehe 3.2.2) (Gruppe B1).

### **3.2.9. Auftauprozess von dreidimensionalen Aggregaten mittels Trypsin**

Eine Petrischale wurde für mindestens eine Stunde mit 5mL Matrigellösung inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurden 10mL E8 Kulturmedium, 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF auf die Platte gegeben. Das Kryoröhrchen wurde aus dem Gefrierschrank entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C gelagert, bis optisch keine Eiskristalle mehr sichtbar waren. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde tröpfchenweise in ein 15mL Röhrchen mit E8 Medium gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 1000rpm wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit PBS resuspendiert und für zwei Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Es wurden 2mL Trypsin auf das Zellpellet gegeben und resuspendiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit dem Vortexgerät durchmischt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Trypsinreaktion wurden 2mL 20% FBS auf das Gemisch gegeben und resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 1000rpm für zwei Minuten wurde der Überstand abgesaugt und mit E8

Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde für die direkte Analyse extrahiert (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Die restliche Zellsuspension wurde auf die bereits vorbereitete Petrischale transferiert und für 24h in Kultur genommen (siehe 3.2.2) (Gruppe B2).

Da ein nicht zu vernachlässigender Effekt des Trypsins auf das Zellüberleben bekannt ist<sup>160</sup>, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, um den Effekt der Trypsinierung herauszurechnen (Gruppe Trypsinkontrolle). So konnte lediglich der Effekt der Kryokonservierung bewertet und nicht der toxische Einfluss von Trypsin in die spätere statistische Analyse miteinbezogen werden. Es wurden  $3 \times 10^6$  Einzelzellen für 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden spiralförmig abgetragen. Das entstandene dreidimensionale Aggregat wurde für 10min mit Trypsin nach dem oben beschriebenen Schema bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 2mL 20% FBS in die Lösung hinzugegeben und resuspendiert. Die Zelllösung wurde für zwei Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands und Resuspension mit E8 Medium wurde ein Teil der Zellen für weitere Analysen verwendet (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Die restlichen Zellen wurden für 24h in Kultur genommen und anschließend analysiert (siehe 3.2.2).

### **3.2.10. Einfrierprozess der Stammzellen nach neuem Protokoll**

Die Durchführung der Kryokonservierung gemäß dem Protokoll, das bislang nur für ovarielles Gewebe etabliert ist, wurde freundlicherweise von Dr. Volodimir Isachenko mit leichten Modifikationen durchgeführt.<sup>110,148-151</sup> Die Transportzeit der Zellsuspension aus dem Labor der Neurophysiologie und vegetativen Physiologie in das Labor der gynäkologischen Reproduktionsmedizin betrug drei bis vier Minuten. Der Transport der Zellsuspensionen, bestehend aus Einzelzellen (Gruppe C) bzw. aus dreidimensionalen Aggregaten (Gruppe D1, D2 und E), erfolgte in einer Plastikbox, gefüllt mit Styropor. Die Zellen wurden in 10mL E8 Medium transportiert.

Damit ein Einfluss des Transports auf das Zellüberleben ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Versuchsreihe mit einer Positivkontrolle durchgeführt (Gruppe Transportkontrolle). Es wurden  $3 \times 10^6$  Einzelzellen für 3 Tage kultiviert. Das konfluente Monolayer wurde gemäß dem oben beschriebenen Protokoll in eine Einzelzellsuspension überführt und ein Teil wurde analysiert (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Die Einzelzellsuspension wurde in das gynäkologische Labor transportiert. Zur Analyse wurde die Einzelzellsuspension in das Labor der Physiologie zurückgebracht. Ein Teil der Zellen wurde gemäß dem oben beschriebenen Protokoll analysiert. Der Rest der Zellen wurde für 24h in Kultur genommen und anschließend analysiert (siehe 3.2.2).

Nach dem Transport der einzufrierenden Zellen wurden diese aus der Transportbox entnommen.

Wurden dreidimensionale Aggregate eingefroren, so wurde dafür das Gewebe entnommen und in einen Probenbehälter transferiert. Es wurde ein Sättigungsschritt („*Saturation*“) mittels der „*dropping method*“<sup>110</sup> durchgeführt. In einem 50mL Röhrchen wurde eine 50mL, 40%(v/v) Ethylenglykol-haltige Sättigungslösung platziert, die tröpfchenweise für 40 Minuten auf die Zellen unter konstanter Rotation bei 200 Oszillationen pro Minute gegeben wurde. Um eine komplette Sättigung der Zellen mit Ethylenglykol zu erreichen, wurden die Zellen nach Beendigung der Zeit additive 10 Minuten mit der Lösung inkubiert.

Wurden Einzelzellen eingefroren, so erfolgte eine kurze Zentrifugation für 30 Sekunden bei 1000rpm. Nach Absaugen des Überstands erfolgte eine Resuspension mit der Sättigungslösung. Da die Zellen als Einzelzellsuspension vorlagen, konnte eine homogene Perfusion mit der Sättigungslösung gewährleistet werden, sodass hier keine *dropping method* durchgeführt wurde. Die Inkubationszeit mit der Sättigungslösung bei Raumtemperatur betrug 5 Minuten.

In ein Kryoröhrchen wurden 1,8mL Einfriermedium gegeben. Das Röhrchen wurde in Eiswasser bei 0-4°C gekühlt. Das Gewebe wurde aus der Sättigungslösung entfernt und in das abgekühlte Kryoröhrchen gegeben.

Wurden Einzelzellen eingefroren, so fand nach dem Sättigungsschritt eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 1000rpm statt. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 1,8mL des gynäkologischen Einfriermediums resuspendiert, welches zuvor auf 0-4°C abgekühlt worden waren. Die Einzelzellsuspensionslösung wurde in das Kryoröhrchen, welches ebenfalls auf 0-4°C abgekühlt wurde, transferiert.

Die Kryoröhrchen wurden in eine *IceCube 14S* Einfriermaschine gegeben. In diese waren verschiedene Gefrierkammern integriert, welche auf 2°C für 20-30 Minuten abgekühlt wurden. Die Kryoröhrchen wurden in die Gefrierkammern gestellt. Das Kryokonservierungsprogramm wurde gestartet:

(1) Die Starttemperatur betrug 0-4°C. Die Proben wurden von der Starttemperatur auf -6°C mit einer niedrigen Kühlrate von -2°C/min gekühlt.

(2) Es folgte ein *Autoseeding*-Schritt durch einen *Auto-Seeding*-Block. Die Temperatur der Kryoröhrchen wurde für 10 Minuten bei -6°C gehalten. Der *Auto-Seeding*-Block war bereits in der Einfriermaschine integriert. Der Block stellte einen Kontakt zwischen dem oberen Teil der Gefrierkammer und der Röhre, die Flüssigstickstoff enthielt, sicher. Bei -6°C wurde vermehrt Flüssigstickstoff in die leitende Röhre hineingegeben, sodass die Formierung von Eiskristallen initiiert wurde.

(3) Die Proben wurden von -6°C auf -34°C bei einer Kühlrate von -0,3°C/min abgekühlt.

(4) Bei Erreichen von  $-34^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben in Flüssigstickstoff gelagert. Die Kühlrate betrug in diesem Schritt  $-220^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Einzelne Komponenten aus dem gynäkologischen Kryokonservierungsprotokoll werden in Abbildung 10 veranschaulicht:

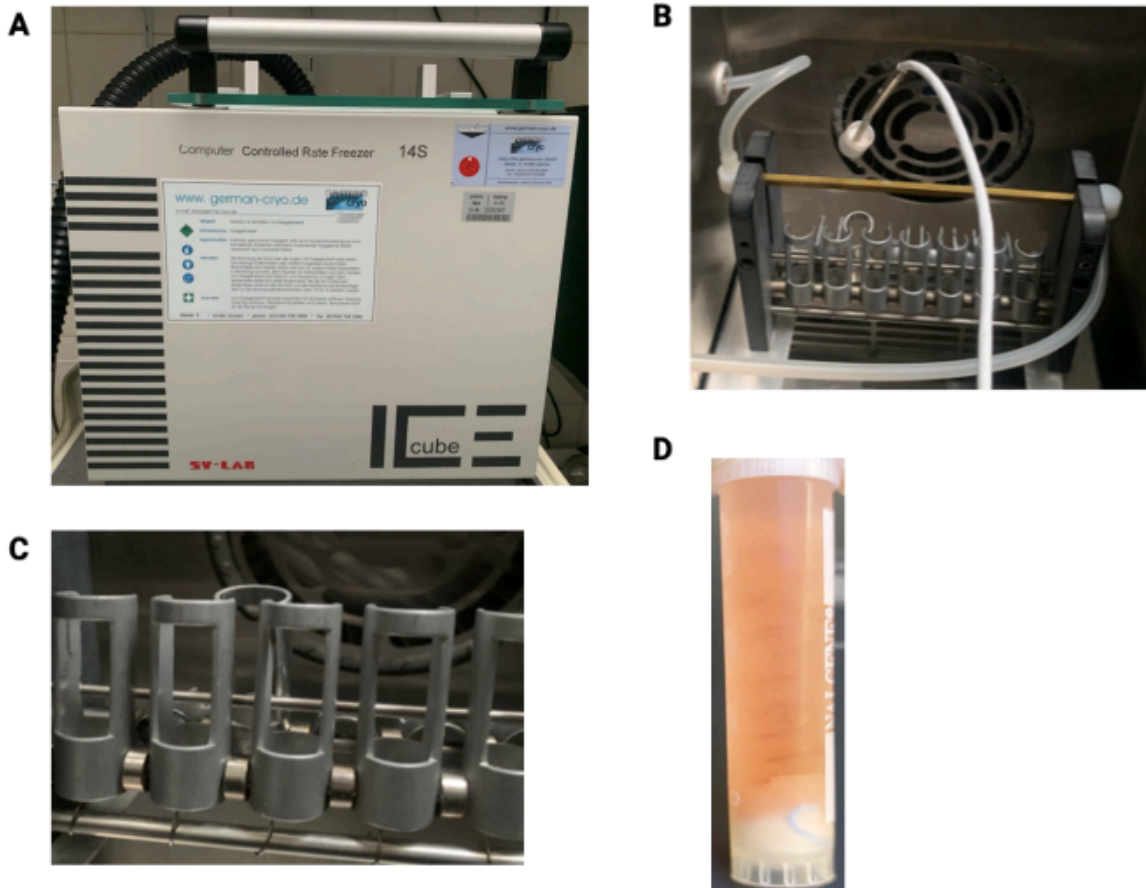


Abbildung 10: Darstellung des IceCubes 14S und eines Kryoröhrchens in der Gynäkologie

Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.

(A) Zu sehen ist die automatisierte Einfriermaschine IceCube 14S, welche für die Kryokonservierung von ovariellen Gewebe verwendet wird.

(B) und (C) Darstellung der Einfrierkammern im IceCube 14S Einfrierautomaten, welche als Halteapparat für die Kryoröhrchen dienen.

(D) Das Kryoröhrchen wurde in das Einfriergerät platziert. In diesem Fall wurde ein bereits eingefrorenes, 5mL Kryoröhrchen fotografiert, an dessen Boden sich ein Präpariertupfer befand (Gruppe E).

### 3.2.11. Auftauprozess nach neuem Protokoll

Die Röhrchen wurden sieben Tage nach der Kryokonservierung aufgetaut. Die Kryoröhrchen wurden aus dem Flüssigstickstoff entnommen und in ein Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  platziert. Die Expositionszeit wurde visuell kontrolliert. Bei Erreichen einer eiskristallfreien Lösung wurde

das Röhrchen aus dem Wasserbad entfernt. Die finale Temperatur des Mediums betrug zwischen 4-10°C.

Wurden dreidimensionale Aggregate eingefroren, so wurde der gesamte Inhalt der Kryoröhrchen in ein 15mL Röhrchen transferiert. 90% des Einfriermediums wurden als Überstand entfernt. Der restliche Inhalt wurde in einen Probenbehälter transferiert. Der Probenbehälter wurde gemäß der *dropping method* mit 10mL einer 37°C warmen Saccharosehaltigen Auftaulösung befüllt. Die Inkubationszeit in der Lösung betrug 7 Minuten. Es wurden 90% der Lösung entfernt und 10mL E8 Medium zum Gewebe hinzugefügt. Dabei wurde die *dropping Methode* erneut verwendet, um so eine stufenweise Rehydratation und folglich eine graduelle Gewöhnung an die veränderten osmotischen Verhältnisse zu gewährleisten. Das Gewebe wurde für 30 Minuten im basalen Kulturmedium inkubiert. Das dreidimensionale Aggregat wurde drei Mal mit PBS gewaschen und der Auftauprozess war abgeschlossen.<sup>110,151</sup>

Wurden Einzelzellen eingefroren, so wurden diese in ein 15mL Röhrchen transferiert und bei 1000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und es erfolgte eine direkte Resuspension mit 10mL der Auftaulösung. Die direkte Resuspension wurde nicht gemäß der *dropping method* durchgeführt. Die Inkubationszeit mit der Auftaulösung betrug 2 Minuten. Nach Zentrifugation bei 1000rpm für 30 Sekunden wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde ohne *dropping method*, jedoch tröpfchenweise mit E8 Kulturmedium resuspendiert. Es fand keine Inkubation der Einzelzellsuspension mit dem Kulturmedium bei Raumtemperatur statt.

Die Einzelzellsuspension sowie die dreidimensionalen Aggregate wurden in das Labor der Physiologie gebracht. Ein Teil der aufgetauten Zellen wurde für weitere Analysen verwendet (siehe 3.2.3 und 3.2.4). Damit das dreidimensionale Aggregat für eine weitere Analyse verwendet werden konnte, wurde pro Durchgang je ein komplettes Kryoröhrchen für die Zellanalyse direkt nach dem Auftauen verwendet. Die Zellen wurden entweder mit einem 40µm Strainer gefiltert oder mit Trypsin inkubiert, um so Einzelzellen zu erhalten (siehe 3.2.8 und 3.2.9). Die restlichen Kryoröhrchen wurden auf eine separate Petrischale mit 10mL E8-haltigem Medium, 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF ausplattiert und für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.2.12. Auftauprozess bei 100°C**

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Auftauen bei 100°C erprobt, um die Auftauzeit zu minimieren und so den zelltoxischen Effekt der Kryoprotektiva zu reduzieren. Zum Schutz der Zellen wurde bei dieser Gruppe bereits im Einfrierprozess ein Präpariertupfer an den Boden des Kryoröhrchens platziert (siehe Abbildung 10, (D)). Nachdem die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen worden waren, wurden die Röhrchen für 30s bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Röhrchen wurden in kochendes Wasser bei 100°C positioniert. Unter visueller Kontrolle wurde das Kryoröhrchen bei vollständigem Fehlen von Eiskristallen aus dem heißen Wasser entnommen. Die Zellen wurden gemäß dem neuen Protokoll zum Auftauen von dreidimensionalen Aggregaten behandelt und mit einem 40µm Strainer gefiltert (siehe 3.2.11).

### **3.2.13. Messungen 24h nach Auftauen**

Zur Analyse der langfristigeren Effekte wurden die aufgetauten Zellen für 24 Stunden wieder in Kultur genommen (siehe 3.2.2). Nach einem Tag wurde das nicht-konfluente Monolayer wieder in Einzelzellen überführt (siehe 3.2.3), damit Einzelzellen der Analyse 24h nach der Kryokonservierung (=T2) zur Verfügung standen. Die Zellen wurden angefärbt und mittels des Cellometer®, durch die Neubauer Zählkammer und durch das Fluoreszenzlichtmikroskop analysiert (siehe 3.2.3 und 3.2.4).

### **3.2.14. Einfrieren und Auftauen von undifferenzierten *embryoid bodies***

Um Zellsphäroide (*embryoid bodies*) aus hiPSCs zu generieren, wurde das Protokoll von Hamad et al. (2019)<sup>49</sup> verwendet. Eine E8-haltige Suspensionslösung voller Einzelzellen mit einer Konzentration von  $0,3 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter wurde hergestellt (siehe 3.2.3). 10ml, also  $3 \times 10^6$  Zellen, wurden auf eine 10cm große Petrischale platziert. 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF wurden in die Petrischale hinzugefügt. Die Petrischale wurde ohne Medienwechsel für zwei Tage in einen Schüttelinkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> platziert.

Nach Ablauf der 48 Stunden befanden sich in der Mitte der Petrischale makroskopisch sichtbare Zellsphäroide. Der Inhalt der Petrischale wurde in ein 15mL Röhrchen transferiert. Nach 15 Minuten sanken die Sphäroide auf den Boden des Röhrchens ab. Der Überstand wurde abgesaugt. Es erfolgte eine Resuspension mit 1,8mL des Einfriermediums. Die Suspensionslösung wurde in ein Kryoröhrchen transferiert. Pro Durchlauf wurde je ein Röhrchen als Positivkontrolle verwendet. Die anderen Röhrchen wurden direkt eingefroren. Das Kryoröhrchen wurde schnellstmöglich in einem Gefrierschrank bei -80°C in einem Styroporbehälter gelagert. Die Einfrierrate lag annähernd bei -1°C/min.

Zur Analyse der Positivkontrolle mussten aus den Sphäroiden Einzelzellen generiert werden. Die Positivkontrolle wurde für 30 Sekunden bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und zum Pellet wurden 2mL Trypsin hinzugefügt. Die Lösung wurde auf eine Petrischale transferiert und für 25 Minuten auf einen Schüttelinkubator platziert. Es wurden 2mL 20% FBS zur Lösung hinzugegeben. Der Inhalt der Petrischale wurde mittels eines 40µm Strainers gefiltert und für zwei Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands und Resuspension mit E8 Medium wurde die Lösung für weitere Analysen benutzt

(siehe 3.2.3). Es wurde ein weiteres Mikroskop (Nikon Eclipse Ts2) zur Bestimmung der Zelldurchmesser verwendet, da das Cellometer® die *embryoid bodies* aufgrund des hohen Durchmessers nicht analysieren konnte. Zur Bestimmung der Durchmesser der Zellsphäroide wurde die Software *NIS-Elements BR* (Version 5.21.03) benutzt.

Sieben Tage nach der Kryokonservierung wurden die Sphäroide aufgetaut. Es wurde eine 10cm Petrischale mit 10mL E8 Medium bedeckt. Zur Platte wurden 10µL ROCK Inhibitor, 10µL TGF und 100µL bFGF hinzugefügt. Das Kryoröhrchen wurde aus dem Gefrierschrank entnommen und in ein Wasserbad bei 37°C gelagert, bis optisch keine Eiskristalle mehr zu sehen waren. In ein 15mL Röhrchen, welches mit E8 Medium befüllt worden war, wurde der Inhalt des Kryoröhrchens tropfenweise transferiert. Das Gemisch wurde für zwei Minuten bei 1000rpm zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Es erfolgte eine Resuspension in Kulturmedium. Ein Teil wurde für die direkte Analyse verwendet. Das Protokoll zur Generierung von Einzelzellen aus Sphäroiden wurde wiederholt (siehe oben). Sobald Einzelzellen generiert wurden, wurden diese analysiert (siehe 3.2.3, siehe oben). Da man in den Aufnahmen zu den Zeitpunkten T1 und T2 eine Vielzahl an Zelltrümmern sehen konnte, deren Durchmesser aufgrund der unscharfen Begrenzung nicht genau bestimmt werden konnte, wurde lediglich der Durchmesser intakter Zellsphäroide mit scharfer Randbegrenzung bestimmt.

Die restlichen, nicht-trypsinisierten Sphäroide wurden für 24h kultiviert. Es wurden Sphäroide auf eine Petrischale mit 10mL Kulturmedium, 10 µL ROCK-Inhibitor, 10 µL TGF und 100µL bFGF pipettiert und in einem Schüttelinkubator für 24h inkubiert. Das Protokoll zur Generierung von Einzelzellen aus Sphäroiden wurde wiederholt (siehe oben). Die Einzelzellen wurden analysiert (siehe 3.2.3, siehe oben).

### **3.2.15. Versuchsauswertung und Statistik**

Alle Analysen wurden mit Microsoft Excel (Version 2311) sowie der SPSS-Software für Mac (Version 29) durchgeführt. Jedes Experiment wurde insgesamt drei Mal wiederholt (n=3).

Zur Ermittlung der berechneten Parameter wurde für jede Gruppe der arithmetische Mittelwert gebildet. Bei den in den Abbildungen dargestellten Überlebensraten handelt es sich um den ermittelten Durchschnittswert der jeweiligen Gruppen. In den Abbildungen 11 bis 16 wurde grafisch ein gepoolter Standardfehler über alle Gruppen eines Zeitpunktes eingezeichnet. Im Fließtext wurden die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Es handelt sich generell um explorative Analysen, wobei die *p*-Werte als explorativ anzusehen sind. Auf Basis biologischer Plausibilität und bestehender Vorkenntnisse wurden teilweise gezielt Hypothesen formuliert. Diese Hypothesen dienten der Überprüfung potenzieller Effekte einzelner Parameter auf das Überleben von hiPSCs nach der Kryokonservierung. Die statistische Auswertung erfolgte daher mit einem explorativ-konfirmatorischen Anspruch, bei dem

potenziell relevante Unterschiede identifiziert werden sollten, ohne dabei durch zu strikte Korrekturen bedeutsame Effekte zu übersehen.

Zum Vergleich der Überlebensraten und der Proliferationsrate wurde je nach Skalenniveau, Anzahl an Faktorstufen der Variablen sowie Art der Stichprobe (verbunden oder unverbunden) der Kruskal-Wallis-Test, der Wilcoxon-Test, der Mann-Whitney-U-Test und der Kolmogorov-Smirnov-Test berechnet. Nach einem signifikanten Kruskal-Wallis-Test wurden zur Identifikation paarweiser Gruppenunterschiede Post-hoc-Vergleiche mittels Dunn-Tests durchgeführt. Diese erfolgten in explorativem Design.

Das Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wurde in Abhängigkeit vom jeweiligen Szenario festgelegt:

Bei Parametern, die zu zwei Zeitpunkten gemessen wurden (z. B. absolute Überlebensrate, relative Überlebensrate, Wiederfindungsrate), wurde zur Kontrolle des  $\alpha$ -Fehlers bei mehrfachen Tests eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Die Korrektur bezieht sich hierbei auf die Anzahl der durchgeführten Tests, nicht auf die Abhängigkeit der Daten. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend auf  $\alpha = 0,025$  angepasst. Ergebnisse mit  $p < 0,025$  wurden als statistisch signifikant gewertet. In den anschließenden Post-hoc-Vergleichen wurde keine weitere Alpha-Korrektur über alle paarweisen Vergleiche hinweg vorgenommen, da es sich um eine explorative Studie mit kleinen Fallzahlen handelt und der Fokus auf der Identifikation möglicher Optimierungsansätze der Kryokonservierung von hiPSCs lag. Eine striktere Korrektur (zum Beispiel nach Bonferroni) hätte das Risiko für einen Fehler 2. Art deutlich erhöht und potenziell relevante Unterschiede verdeckt.<sup>161,162</sup> Entsprechend wurden auch in den paarweisen Tests  $p$ -Werte  $< 0,025$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

In Fällen, bei denen nur ein Zeitpunkt untersucht wurde (z. B. adaptierte Überlebensrate, Proliferationsrate), wurden die  $p$ -Werte explorativ ohne Alpha-Korrektur bewertet. Das Signifikanzniveau lag hier bei  $\alpha = 0,05$ . In diesen Fällen wurden  $p$ -Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert. In den anschließenden Post-hoc-Vergleichen wurde keine Alpha-Korrektur über alle paarweisen Vergleiche hinweg vorgenommen. Auch hier sollten die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden.

Bei Post-hoc Vergleichen nach der ANOVA zur Bestimmung der Sphäroid-Durchmesser zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe 4.9.2) wurden hingegen die automatisch von SPSS berechneten Bonferroni-korrigierten  $p$ -Werte verwendet. Diese wurden mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  verglichen und als statistisch signifikant interpretiert.



Zur Darstellung der Verteilung der Durchmesser der verschiedenen Gruppen wurden vom Cellometer® generierte Histogramme aus je einer Schale gewählt, welche möglichst repräsentativ für die jeweilige Gruppe erschienen. Die Histogramme wurden deskriptiv analysiert.

Zur Bestimmung des Durchmessers der Sphäroide wurde der Durchmesser von insgesamt  $n=40$  Sphäroiden ausgewertet. Die Bestimmung des Durchmessers der Sphäroide erfolgte mit der Software *NIS-Elements BR* (Version 5.21.03) und dem Mikroskop Nikon Eclipse Ts2.

Um einen Unterschied der Durchmesser der Sphäroide zu den verschiedenen Zeitpunkten zu analysieren, wurden eine ANOVA mit Messwiederholung sowie ein Friedman-Test gerechnet. Als Post-hoc-Test wurde bei der ANOVA ein Bonferroni-korrigierter abhängiger t-Test und nach dem Friedman-Test ein Dunn-Bonferroni Test berechnet. Die Voraussetzung der Sphärizität wurde mit dem Mauchly-Test berechnet. Je nach Epsilon-Wert ( $\epsilon$ ) wurde bei Verletzung der Sphärizität entweder die Greenhouse-Geisser- oder Huynh-Feldt-Korrektur angewandt. Da tote Sphäroide oftmals eine unregelmäßige Begrenzung aufwiesen, konnte für diese der Durchmesser nicht genau bestimmt werden. Folglich wurde lediglich der Durchmesser von Sphäroiden bestimmt, welche eine klare Begrenzung aufwiesen.

Um den Effekt der Kryokonservierung hinsichtlich des Zellüberlebens möglichst präzise beschreiben zu können, wurden verschiedene Parameter eingeführt. Die berechneten Parameter orientieren sich an der Arbeit von Pasch (2000)<sup>67</sup>.

Wichtig anzuführen ist, dass sich die Werte der eingesetzten Variablen für T0, T1 und T2 jeweils unterscheiden, was in einigen Formeln aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht erwähnt wird. So wird nicht explizit erwähnt, dass sich der Wert von beispielsweise  $N_{Kryo, lebendig}$  für T1 und T2 unterscheidet. Dies erklärt die verschiedenen Ergebnisse der errechneten Parameter für T0, T1 und T2. Für die Zeitpunkte gilt:

T0: Messung vor der Kryokonservierung

T1: Messung unmittelbar nach der Kryokonservierung bzw. nach dem Auftauen

T2: Messung 24h nach der Kryokonservierung

Außerdem ist zur Vollständigkeit zu erwähnen, dass bei der Trypsin-Positivkontrollgruppe und der Transport-Positivkontrollgruppe die Zellen nicht kryokonserviert wurden. Zur Übersichtlichkeit wurden bei den Formeln die einzelnen Variablen nicht umbenannt. So gilt bei den Berechnungen beispielsweise, dass  $N_{Kryo, lebendig}$  in der Trypsin-Positivkontrollgruppe der Gesamtzahl an lebendigen Zellen nach dem Gebrauch von Trypsin entspricht. Dasselbe gilt für die Transport-Positivkontrollgruppe. So entspricht bei der Gruppe Transportkontrolle beispielsweise  $N_{Kryo, insgesamt}$  der Gesamtzahl an wiedergefundenen Zellen nach dem

Transportprozess. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde dies jedoch nicht für jeden Parameter beschrieben.

Die Wiederfindungsrate beschreibt das Verhältnis der gezählten Zellen nach dem Auftauen und der Gesamtzahl der gezählten Zellen vor der Kryokonservierung:

$$W_{Kryo} = \frac{N_{Kryo,insgesamt}}{N_{insgesamt}} \cdot 100\%$$

$W_{Kryo}$ : Wiederfindungsrate bezogen auf die Kryokonservierung

$N_{Kryo,insgesamt}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{insgesamt}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen vor der Kryokonservierung

Die Wiederfindungsrate für die Gruppe Trypsinkontrolle bezieht sich auf die wiedergefundenen Zellen nach Trypsinierung, da in dieser Gruppe keine Zellen kryokonserviert wurden. Dasselbe gilt für die Gruppe Transportkontrolle. Hier bezieht sich die Wiederfindungsrate auf die wiedergefundenen Zellen nach dem Transport. Dasselbe Prinzip gilt auch für die folgenden Parameter und wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht explizit erwähnt.

Die Basis-Überlebensrate spiegelt das Verhältnis zwischen der Anzahl der lebendigen Zellen vor der Kryokonservierung und der Gesamtzahl an (sowohl toten als auch lebendigen) Zellen vor der Kryokonservierung wider. Die Basis-Überlebensrate dient als Ausgangswert, da eine hohe Basis-Überlebensrate als optimale Voraussetzung für die Analyse des Effekts der Kryokonservierung betrachtet werden kann. Sie entspricht der relativen Überlebensrate zum Zeitpunkt T0, wird jedoch zur besseren Übersichtlichkeit als separater Parameter aufgeführt:

$$S_{basis} = \frac{N_{lebendig}}{N_{insgesamt}} \cdot 100\%$$

$S_{basis}$ : Basis-Überlebensrate

$N_{lebendig}$ : Gesamtzahl an gezählten, lebendigen Zellen vor der Kryokonservierung

$N_{insgesamt}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen vor der Kryokonservierung

Wichtig zu erwähnen ist, dass einzig für die Gruppe S zur Bestimmung der Basis-Überlebensrate eine Trypsinierung notwendig war. Dies liegt darin begründet, dass für die Analyse die Zellen als Einzelzellen benötigt werden. Da Sphäroide für die lichtmikroskopische Analyse mit Trypanblau sowie für die Analyse am Cellometer® zu groß sind, konnte die Vitalität

ohne Aufbrechen der dreidimensionalen Struktur nicht bestimmt werden. Für alle anderen Gruppen wurde Trypsin zur Bestimmung der Basis-Überlebensrate nicht verwendet. Da in der Versuchsreihe, in der im Rahmen der Trypsin-Positivkontrollgruppe der Trypsierungseffekt  $T_{\text{eff}}$  bestimmt wurde, dreidimensionale Aggregate und nicht Sphäroide verwendet wurden, wurde für die Gruppe S die Basis-Überlebensrate nicht korrigiert. Demnach ist es wichtig zu wissen, dass der Wert der Basis-Überlebensrate der Gruppe S sich auf einen Zustand vor der Kryokonservierung, jedoch nach der Trypsinierung bezieht.

Die absolute Überlebensrate gibt das Verhältnis von lebendigen Zellen nach dem Auftauen und der Gesamtzahl der Zellen vor der Kryokonservierung wieder:

$$S_{\text{absolut}} = \frac{N_{\text{Kryo,lebendig}}}{N_{\text{insgesamt}}} \cdot 100\%$$

$S_{\text{absolut}}$ : Absolute Überlebensrate

$N_{\text{Kryo,lebendig}}$ : Gesamtzahl an gezählten, lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{\text{insgesamt}}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen vor der Kryokonservierung

Die relative Überlebensrate beschreibt dahingegen das Verhältnis zwischen der Gesamtzahl der lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung und der Gesamtzahl an Zellen, die nach der Kryokonservierung wiedergefunden wurden:

$$S_{\text{relativ}} = \frac{N_{\text{Kryo,lebendig}}}{N_{\text{Kryo,insgesamt}}} \cdot 100\%$$

$S_{\text{relativ}}$ : Relative Überlebensrate

$N_{\text{Kryo,lebendig}}$ : Gesamtzahl an gezählten lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{\text{Kryo,insgesamt}}$ : Gesamtzahl der wiedergefundenen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

Um zu berücksichtigen, dass nicht alle Zellen aus der Analyse bei T1 nach der Kryokonservierung zum Zeitpunkt T2 wiedergefunden wurden, wurde die adaptierte Überlebensrate eingeführt. Die adaptierte Überlebensrate wertet die nicht-wiedergefundenen Zellen als tot. Für den Zeitpunkt T1 entspricht die adaptierte Überlebensrate der absoluten Überlebensrate. Damit die adaptierte Überlebensrate berechnet werden kann, muss zunächst

die Anzahl an nicht wiedergefundenen Zellen nach der Kryokonservierung bestimmt werden. Diese beschreibt die Differenz aus der Gesamtzahl an gezählten Zellen bei T1 und der Gesamtzahl an gezählten Zellen bei T2.

$$N_{Kryo,nichtgefunden} = N_{Kryo,insgesamt,T1} - N_{Kryo,insgesamt,T2} \quad \text{für } T2$$

$N_{Kryo,nichtgefunden}$ : Gesamtzahl an nicht-wiedergefundenen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen zum Zeitpunkt T2

$N_{Kryo,insgesamt,T1}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{Kryo,insgesamt,T2}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen 24h nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

Die adaptierte Überlebensrate beschreibt das Verhältnis aus den lebendigen Zellen 24h nach der Kryokonservierung und der Summe aus der Gesamtzahl der wiedergefundenen Zellen 24h nach der Kryokonservierung sowie der Gesamtzahl an nicht-wiedergefundenen Zellen nach der Kryokonservierung zum Zeitpunkt T2:

$$S_{adaptiert} = \frac{N_{Kryo,lebendig}}{(N_{Kryo,insgesamt} + N_{Kryo,nichtgefunden})} \cdot 100\%$$

$S_{adaptiert}$ : Adaptierte Überlebensrate

$N_{Kryo,lebendig}$ : Gesamtzahl an gezählten lebendigen Zellen 24h nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{Kryo,insgesamt}$ : Gesamtzahl der wiedergefundenen Zellen 24h nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{Kryo,nichtgefunden}$ : Gesamtzahl an nicht-wiedergefundenen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen zum Zeitpunkt T2

Aufgrund der Ergebnisse wurde ein weiterer Parameter eingeführt, der den toxischen Effekt der Trypsinierung berücksichtigen soll. Dieser wurde durch die Trypsin-Positivkontrollgruppe errechnet.  $T_{eff}$  gibt das Verhältnis von lebendigen Zellen nach Trypsinisierung und der Gesamtzahl der Zellen vor der Trypsinierung wieder.

$$T_{eff} = \frac{N_{Trypsin,lebendig}}{N_{total}} \cdot 100\%$$

$T_{eff}$ : Trypsinisierungseffekt

$N_{\text{Trypsin,lebensdig}}$ : Gesamtzahl der gezählten lebendigen Zellen nach der Trypsinisierung

$N_{\text{total}}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen vor der Trypsinisierung ( $\hat{=}$   $N_{\text{insgesamt}}$ )

Es ist wichtig zu erwähnen, dass nach dem Auftauen die dreidimensionalen Aggregate ohne die Trypsinisierung nicht gezählt und analysiert werden können. So muss für diese Gruppen angenommen werden:  $N_{\text{total}} \hat{=}$   $N_{\text{insgesamt}}$ .

Dies entspricht zwar nicht der Realität, wurde jedoch folgendermaßen gelöst:

In den meisten Arbeiten wird die absolute und relative Überlebensrate verwendet. Die korrigierte Überlebensrate wurde eingeführt, damit lediglich der Effekt der Kryokonservierung unter Ausschluss des toxischen Effekts der Trypsinisierung analysiert werden kann.<sup>67</sup> Dies ist vor allem bei jenen Gruppen wichtig, bei denen ein großer Teil der toten Zellen auf die Trypsinisierung zurückzuführen ist. Der eingesetzte Wert für  $T_{\text{eff}}$  entspricht dabei dem durchschnittlichen  $T_{\text{eff}}$  aus den  $n=3$  Versuchsdurchführungen. Dieser Wert wurde durch die Versuchsreihe im Rahmen der Trypsin-Kontrollgruppe berechnet und beträgt durchschnittlich 0,275. Dieser Wert wird für die Gruppen, welche unmittelbar nach dem Auftauen mit Trypsin inkubiert wurden, angenommen. Da lediglich zum Zeitpunkt T1 die Gruppen B1 und D1 die Zellen nach der Kryokonservierung mit Trypsin inkubiert wurden, wird die korrigierte Überlebensrate nur für diese zwei Gruppen bestimmt.

So gibt die korrigierte Überlebensrate das Verhältnis zwischen lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung und Zellen, die nicht durch die Trypsinisierung geschädigt wurden, an:

$$S_{\text{korrigiert}} = \frac{N_{\text{Kryo,lebensdig}}}{T_{\text{eff}} \cdot N_{\text{total}}} \cdot 100\%$$

$S_{\text{korrigiert}}$ : Korrigierte Überlebensrate

$N_{\text{Kryo,lebensdig}}$ : Gesamtzahl an gezählten, lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$T_{\text{eff}}$ : Trypsinisierungseffekt ( $=$  0,275)

$N_{\text{total}}$ : Gesamtzahl der gezählten Zellen vor der Trypsinisierung ( $\hat{=}$   $N_{\text{insgesamt}}$ )

Da die dreidimensionalen Aggregate ohne Trypsinisierung nicht gezählt werden können, muss auch in diesem Fall  $N_{\text{total}} \hat{=}$   $N_{\text{insgesamt}}$  angenommen werden. So gilt:

$$S_{\text{korrigiert}} = \frac{N_{\text{Kryo,lebensdig}}}{T_{\text{eff}} \cdot N_{\text{insgesamt}}} \cdot 100\%$$

$N_{Kryo, lebendig}$ : Gesamtzahl an gezählten, lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$T_{eff}$ : Trypsinisierungseffekt

$N_{insgesamt}$ : Gesamtzahl an gezählten Zellen vor der Kryokonservierung

Da  $T_{eff}$  durch die Trypsin-Positivkontrollgruppe bestimmt wurde und diese hiPSCs vor der Trypsinisierung als dreidimensionale Aggregate vorlagen, kann  $T_{eff}$  für die Experimente mit Sphäroiden (Gruppe S) wie bereits beschrieben nicht übertragen werden (siehe oben). Da Sphäroide bzw. *embryoid bodies* ohne vorherige Trypsinisierung nicht gezählt werden können, wurde auf die Bestimmung der korrigierten Überlebensrate für Gruppe S verzichtet.

Damit ein längerfristiger Effekt der Kryokonservierung auf das Zellüberleben bewertet werden kann, wurde die Proliferationsrate eingeführt. Dabei wird die Differenz aus den lebendigen Zellen 24h nach der Kryokonservierung und den lebendigen Zellen direkt nach der Kryokonservierung mit den lebendigen Zellen direkt nach der Kryokonservierung ins Verhältnis zueinander gesetzt:

$$P = \frac{N_{Kryo, lebendig, T2} - N_{Kryo, lebendig, T1}}{N_{Kryo, lebendig, T1}}$$

P: Proliferationsrate

$N_{Kryo, lebendig, T2}$ : Gesamtzahl an gezählten, lebendigen Zellen 24h nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

$N_{Kryo, lebendig, T1}$ : Gesamtzahl an gezählten, lebendigen Zellen unmittelbar nach der Kryokonservierung/nach dem Auftauen

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Basis Überlebensrate

Die Basis Überlebensrate spiegelt das Verhältnis zwischen der Gesamtzahl der lebendigen Zellen vor der Kryokonservierung und der Gesamtzahl an (sowohl toten als auch lebendigen) Zellen vor der Kryokonservierung wider. Die Basis Überlebensrate wurde eingeführt, um für die weitergehenden Analysen einen Referenzwert zu schaffen, der den Zustand vor der Kryokonservierung wiedergab. Außerdem konnte durch die Basis Überlebensrate überprüft werden, ob sich die einzelnen Gruppen bereits vor der Kryokonservierung unterschieden.

Die mittlere Basis Überlebensrate der einzelnen Gruppen kann gemäß Abbildung 11 folgendermaßen dargestellt werden:

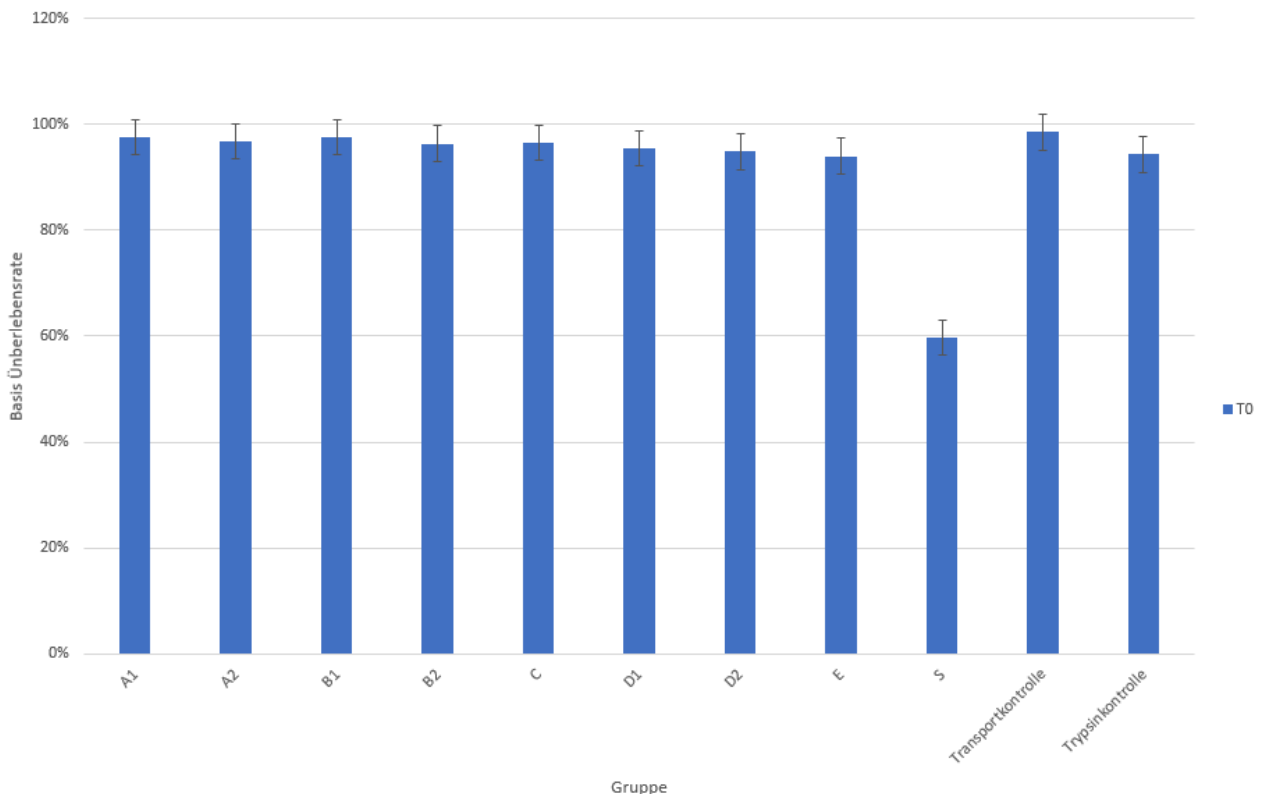


Abbildung 11: Darstellung der mittleren Basis Überlebensrate  $S_{basis}$  der hiPSCs

Die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen den gepoolten Standardfehler des Mittelwertes pro Zeitpunkt.

Es konnte generell beobachtet werden, dass für alle Gruppen, ausgenommen für die Gruppe S, die durchschnittliche Basis Überlebensrate mindestens 94,02% betrug. Somit konnte von einer hohen Basis Überlebensrate ausgegangen werden. Insgesamt betrug die durchschnittliche Basis Überlebensrate für alle Gruppen  $92,89\% \pm 10,86\%$ . Eine hohe Basis Überlebensrate kann als notwendige Voraussetzung für die Kryokonservierung der hiPSCs betrachtet werden.

Die höchste durchschnittliche Basis Überlebensrate konnte in der Transportkontrollgruppe mit einem Wert von  $98,52\% \pm 0,81\%$  beobachtet werden.

Die durchschnittliche Basis Überlebensrate für Gruppe S betrug  $59,70\% \pm 3,98\%$  und war somit in dieser Gruppe am niedrigsten. Wichtig zu erwähnen ist, dass einzig die Gruppe S zur Bestimmung der Basis Überlebensrate mit Trypsin inkubiert werden musste. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Basis Überlebensrate der Gruppe S höher lag. Demnach ist für die Interpretation wichtig zu wissen, dass sich der Wert der Basis Überlebensrate der Gruppe S auf einen Zustand vor der Kryokonservierung, jedoch nach der Trypsinierung bezieht.

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Gruppen sich in der Basis Überlebensrate untereinander unterscheiden, wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Der Test ergab, dass einzelne Gruppen sich in ihrer Basis Überlebensrate unterschieden,  $H(10) = 24,05$  und  $p = 0,007$ .

Um zu testen, welche Gruppen sich unterscheiden, wurden paarweise Dunn-Post-hoc-Tests gerechnet. Die nachfolgenden paarweisen Post-hoc-Vergleiche wurden im Rahmen einer explorativen Analyse durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an Vergleichspaarungen, die sich aus den insgesamt 11 Gruppen ergeben, wurde im Rahmen der explorativen Analyse auf eine zusätzliche Korrektur der  $\alpha$ -Fehlerrate verzichtet. Dies erfolgte außerdem, um trotz kleiner Fallzahlen einen potenziellen Anstieg des Fehlers 2. Art zu vermeiden und potenziell relevante Unterschiede nicht zu übersehen. Entsprechend wurden  $p$ -Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

So konnte beobachtet werden, dass sich die Basis Überlebensrate der Gruppe S von den Gruppen A1 (MW=  $97,61\% \pm 0,73\%$ ), A2 (MW=  $96,76\% \pm 2,39\%$ ), B1 (MW=  $97,57\% \pm 1,01\%$ ), B2 (MW=  $96,38\% \pm 1,05\%$ ), C (MW=  $96,54\% \pm 1,27\%$ ) und Transportkontrolle (MW=  $98,52\% \pm 0,81\%$ ) signifikant unterschied mit  $p \leq 0,031$ . Die paarweisen Vergleiche zwischen Gruppe S und den Gruppen D1 (MW=  $95,53\% \pm 1,37\%$ ), D2 (MW=  $94,82\% \pm 0,55\%$ ), E (MW=  $94,02\% \pm 0,91\%$ ) und Trypsinkontrolle (MW=  $94,30\% \pm 0,84\%$ ) ergaben keinen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied. Bei den in Klammern angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den Mittelwert der Basis Überlebensraten der jeweiligen Gruppe zum Zeitpunkt T0. Die Kryokonservierung jeder Gruppe wurde drei Mal ( $n=3$ ) wiederholt. Die Messung der Basis Überlebensrate jeder Gruppe wurde drei Mal bestimmt.

Die Mehrheit der Post-hoc-Vergleiche zeigte keine signifikanten Unterschiede. Für die Transportkontrollgruppe ergab sich ein Unterschied zu den Gruppen D1, D2, E und der



Trypsinkontrollgruppe ( $p < 0,05$ ), der im Rahmen der explorativen Analyse als signifikant gewertet wurde. Außerdem präsentierten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppenkonstellationen E und A1, E und B1 sowie B1 und Trypsinkontrolle mit  $p \leq 0,045$ . Alle anderen paarweisen Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend ließ sich darstellen, dass sich die Basis Überlebensraten der einzelnen Gruppen größtenteils nicht signifikant voneinander unterschieden. Es fiel insbesondere auf, dass sich die Basis Überlebensrate der Gruppe S von allen Gruppen deskriptiv unterschied. Bei der Interpretation eines solchen statistischen Unterschieds sollte jedoch die Trypsinierung der Gruppe S bedacht werden.

#### **4.2. Absolute Überlebensrate**

Die absolute Überlebensrate gibt das Verhältnis von lebendigen Zellen nach dem Auftauen und der Gesamtzahl der Zellen vor der Kryokonservierung wieder. Demnach stellt die absolute Überlebensrate einen Parameter dar, anhand dessen man die Kryokonservierung bewerten kann.

Für jeden Zeitpunkt (T1 und T2) wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Da zwei Tests mit abhängigen Daten berechnet wurden, wurde zur Kontrolle des  $\alpha$ -Fehlers eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Dabei wurde das Signifikanzniveau entsprechend auf  $\alpha = 0,025$  angepasst. Ergebnisse mit  $p < 0,025$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

So kann die mittlere absolute Überlebensrate in Abbildung 12 dargestellt werden:

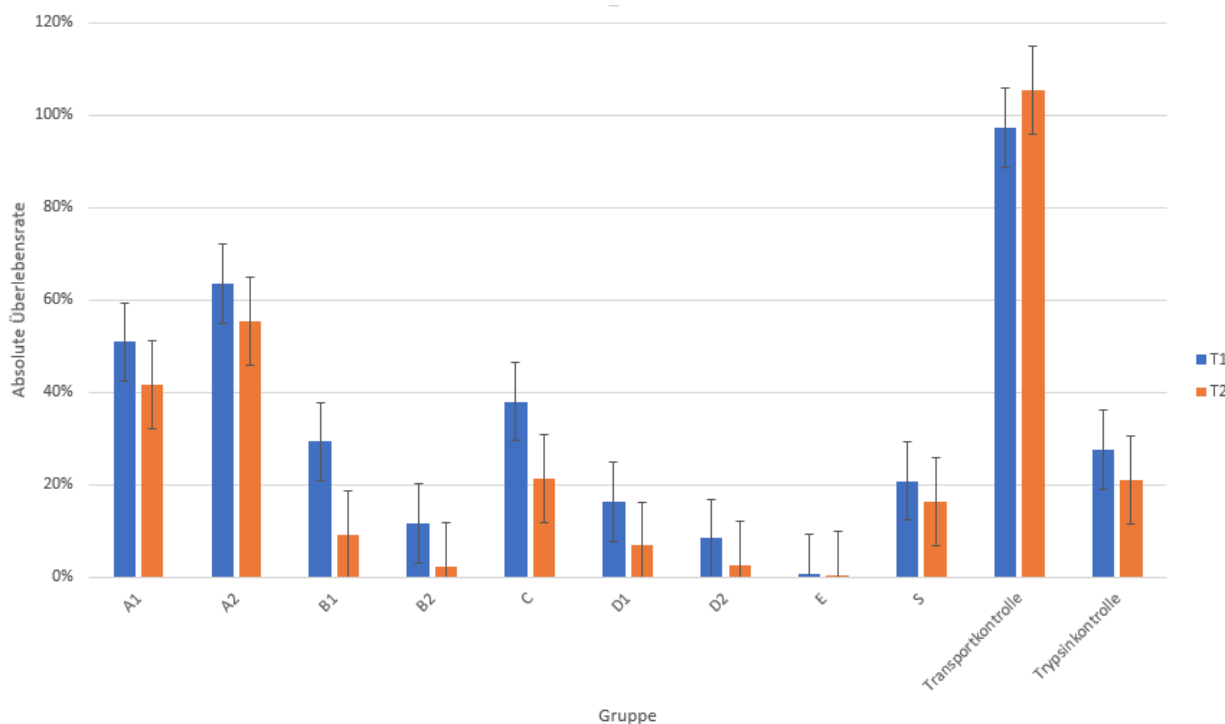


Abbildung 12: Darstellung der mittleren absoluten Überlebensrate  $S_{\text{absolut}}$  der hiPSCs

Die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen den gepoolten Standardfehler des Mittelwertes pro Zeitpunkt.

Die absolute Überlebensrate variierte in ihrem Ausmaß bei Betrachtung der verschiedenen Gruppen. So betrug die absolute Überlebensrate für alle Gruppen bei T1 durchschnittlich  $33,12\% \pm 27,62\%$  und für T2 durchschnittlich  $25,66\% \pm 30,63\%$ . Folglich ließ sich beobachten, dass die absolute Überlebensrate aller Gruppen zum Zeitpunkt T2 geringer war als zum Zeitpunkt T1. Die höchste Mittelwertdifferenz zwischen den Zeitpunkten wies die Gruppe B1 mit  $-20,29\%$  auf.

Eine absolute Überlebensrate von über 100% in der Transport-Positivkontrollgruppe lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen nach 24-stündiger Inkubation proliferierten. So betrug die absolute Überlebensrate für T1  $97,33\% \pm 2,50\%$  und für T2  $105,30\% \pm 2,83\%$ .

Bei der Trypsin-Positivkontrollgruppe belief sich die durchschnittliche absolute Überlebensrate unmittelbar nach der Trypsinierung auf  $27,53\% \pm 6,54\%$ . Nach 24-stündiger Inkubation sank der durchschnittliche Wert auf  $21,09\% \pm 0,72\%$  ab, sodass eine negative Proliferationsrate verzeichnet werden konnte (siehe 4.8). Der zytotoxische Effekt des Trypsins auf die hiPSCs wurde bei der korrigierten Überlebensrate berücksichtigt (siehe 4.7).

Gruppe S wies zum Zeitpunkt T1 eine durchschnittliche absolute Überlebensrate von  $20,81\% \pm 9,04\%$  auf. Dieser Wert erniedrigte sich zum Zeitpunkt T2 auf  $16,40\% \pm 4,22\%$ . Dies entsprach einer Mittelwertdifferenz zwischen den beiden Zeitpunkten von  $4,41\%$ .

Bei den kryokonservierten Gruppen konnte die durchschnittlich höchste, absolute Überlebensrate unmittelbar nach dem Auftauen für die Gruppe A2 mit  $63,57\% \pm 4,03\%$

verzeichnet werden. Die durchschnittlich niedrigste, absolute Überlebensrate zum Zeitpunkt T1 konnte bei der Gruppe E mit  $0,61\% \pm 0,20\%$  beobachtet werden.

Betrachtet man die absolute Überlebensrate nach 24-stündiger Inkubation, so kann konstituiert werden, dass diese für die Gruppe A2 mit  $55,28\% \pm 6,79\%$  unter allen kryokonservierten Gruppen am höchsten und für die Gruppe E mit  $0,47\% \pm 0,09\%$  am niedrigsten war.

Um zu überprüfen, ob sich die durchschnittlichen absoluten Überlebensraten zwischen den Gruppen unterscheiden, wurde für jeden Zeitpunkt ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Dieser ergab für den Zeitpunkt T1, dass zwischen einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied bestand,  $H(10) = 30,61$  und asymptotisches  $p < 0,001$ . Für den Zeitpunkt T2 konnte ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Gruppen festgestellt werden,  $H(10) = 31,38$  und asymptotisches  $p < 0,001$ .

Die Dunn-Post-hoc-Vergleiche wurden im Rahmen einer explorativen Analyse durchgeführt. Zur Reduktion des  $\alpha$ -Fehlers bei zwei Zeitpunkten wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0,025$  angepasst. Eine weitergehende Korrektur über alle paarweisen Tests hinweg wurde nicht vorgenommen, um potenziell relevante Unterschiede nicht zu übersehen und einen möglichen Anstieg des Fehlers 2. Art bei kleiner Fallzahl zu vermeiden. Entsprechend wurden  $p$ -Werte  $< 0,025$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

Um zu analysieren, ob Einzelzellsuspensionen eine höhere Überlebensrate als dreidimensionale Aggregate aufwiesen, mussten die Gruppen A1 (MW=  $46,31\% \pm 1,92\%$ ), A2 (MW=  $59,42\% \pm 5,41\%$ ) und C (MW=  $29,70\% \pm 1,93\%$ ) jeweils paarweise mit den Gruppen B1 (MW=  $19,17\% \pm 3,26\%$ ), B2 (MW=  $6,96\% \pm 0,69\%$ ), D1 (MW=  $11,53\% \pm 2,62\%$ ), D2 (MW=  $5,43\% \pm 1,11\%$ ) und E (MW=  $0,54\% \pm 0,15\%$ ) verglichen werden. Bei den in Klammern angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den Mittelwert der absoluten Überlebensraten der jeweiligen Gruppe über beide Zeitpunkte gemittelt. Die Kryokonservierung jeder Gruppe wurde drei Mal ( $n=3$ ) wiederholt, sodass die absolute Überlebensrate für jede Gruppe ebenfalls drei Mal bestimmt wurde.

Bei Betrachtung der Säulendiagramme konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die Gruppen A1, A2 und C zu beiden Zeitpunkten eine höhere absolute Überlebensrate im Vergleich zu den dreidimensionalen Aggregaten verzeichneten. Nach der Auswertung zeigte sich, dass die Gruppen A1, A2 und C eine signifikant höhere absolute Überlebensrate zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zu den Gruppen D2 und E mit  $p \leq 0,023$  hatten. Für den Zeitpunkt T2 konnte dies ebenso beobachtet werden mit  $p = 0,014$ . Der Vergleich zwischen C und D2 zum Zeitpunkt T2 ergab keinen signifikanten Hinweis auf einen Unterschied ( $p = 0,057$ ). Des

Weiteren fiel auf, dass die Gruppe A2 im Vergleich zur Gruppe B2 zum Zeitpunkt T1 eine signifikant höhere absolute Überlebensrate mit  $p = 0,011$  aufwies. Dies konnte für den Zeitpunkt T2 ebenso beobachtet werden mit  $p = 0,004$ . Zu T2 wies die Gruppe A1 eine signifikant höhere absolute Überlebensrate mit  $p = 0,013$  im Vergleich zur Gruppe B2 auf. Alle anderen paarweisen Vergleiche ergaben keinen signifikanten Unterschied mit  $p > 0,025$ .

Damit ein Unterschied zwischen dem bereits etablierten und dem gynäkologischen Protokoll analysiert werden kann, wurden zunächst die Gruppen, in welchen Einzelzellen eingefroren wurden, näher betrachtet. Die paarweisen Vergleiche zwischen den Gruppen A1 und C sowie A2 und C ergaben keine signifikant höhere absolute Überlebensrate der Gruppen A1 und A2 mit  $p > 0,025$ . Deskriptiv sah man jedoch, dass die Gruppen A1 und A2 zu beiden Zeitpunkten eine höhere absolute Überlebensrate im Vergleich zur Gruppe C aufwiesen. So betrug die Mittelwertdifferenz zwischen den Gruppen A1 und C über beide Zeitpunkte hinweg 16,61% und zwischen den Gruppen A2 und C sogar 29,73%.

Ferner wurden die Gruppen, in welchen dreidimensionale Aggregate eingefroren wurden, näher analysiert. Demnach wurden die Gruppen B1 und B2 mit den Gruppen D1 und D2 paarweise verglichen. In keinem der paarweisen Vergleiche wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p > 0,025$ ). Bei Betrachtung der Säulendiagramme fiel jedoch auf, dass eine höhere absolute Überlebensrate zu beiden Zeitpunkten für die Gruppe B1 im Vergleich zur Gruppe D1 beobachtet werden konnte. Hierbei betrug die Mittelwertdifferenz der absoluten Überlebensrate der beiden Gruppen über beide Zeitpunkte hinweg 7,65%. Auch der deskriptive Vergleich zwischen den Gruppen B2 und D2 zeigte, dass eine leicht erhöhte, absolute Überlebensrate mit einer Mittelwertdifferenz über beide Zeitpunkte von 1,15% für die Gruppe B2 beobachtet werden konnte. Dahingegen zeigte der Vergleich zwischen den Gruppen B2 und D1, dass mit einer Mittelwertdifferenz von 4,56% die beobachtete, absolute Überlebensrate der Gruppe D1 über beide Zeitpunkte hinweg höher war.

Zur näheren Analyse der dreidimensionalen Aggregate wurden die Gruppen je nach Mechanismus der Dissoziation eingeteilt. Es konnte beobachtet werden, dass die gefilterten Zellen (Gruppen B1 und D1) eine höhere absolute Überlebensrate als die trypsinierten Gruppen (Gruppen B2 und D2) über beide Zeitpunkte hinweg aufwiesen. Dabei betrug die Mittelwertdifferenz zwischen den Gruppen B1 und B2 über beide Zeitpunkte hinweg 12,21% und zwischen den Gruppen D1 und D2 6,10%. Für keinen der jeweiligen paarweisen Vergleiche ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p > 0,025$ ).

Um einen Unterschied zwischen den verschiedenen Einfriermedien festzustellen, wurden die Gruppen A1 und A2 miteinander verglichen. Der Vergleich ergab für beide Zeitpunkte keinen

signifikanten Unterschied mit  $p > 0,025$ . Nichtsdestotrotz ließ sich beobachten, dass die Gruppe A2 eine höhere absolute Überlebensrate zu beiden Zeitpunkten aufwies. Die Mittelwertdifferenz betrug über beide Zeitpunkte hinweg 13,12%.

Damit die verschiedenen Auftautemperaturen näher analysiert werden können, wurden die Gruppen D1 und E miteinander verglichen. Der Vergleich ergab eine Mittelwertdifferenz von 10,99%, sodass eine höhere absolute Überlebensrate für die Gruppe D1 beobachtet werden konnte. Die Analyse ergab jedoch für diesen paarweisen Vergleich keinen Hinweis auf einen Unterschied mit  $p > 0,025$ .

Zusammenfassend fiel bei der deskriptiven Analyse auf, dass Einzelzellen eine höhere Überlebensraten aufwiesen als 3D-Aggregate. Insbesondere für Einzelzellen, die nach dem etablierten Protokoll eingefroren und aufgetaut wurden, konnte eine hohe absolute Überlebensrate beobachtet werden. Für alle kryokonservierten Gruppen konnte zum Zeitpunkt T2 eine Erniedrigung der absoluten Überlebensrate im Vergleich zum Zeitpunkt T1 observiert werden.

#### **4.3. Transporteffekt**

Bei einigen Gruppen fand ein kurzer Transport der Zellen zwischen dem gynäkologischen Labor und dem Labor der Neurophysiologie und vegetativen Physiologie statt. Damit bestimmt werden kann, ob der Transport jener Zellen, welche im gynäkologischen Labor eingefroren wurden, einen Einfluss auf das Zellüberleben hat, wurde die Transportkontrollgruppe eingeführt. Dazu wurden Zellen im Labor der Physiologie analysiert, in das gynäkologische Labor transportiert und ohne Kryokonservierung wieder zur Analyse zurückgebracht. So dient die Basis Überlebensrate als Ausgangswert vor dem Transport, welche mit der gemessenen, absoluten Überlebensrate nach dem Rücktransport verglichen wurde.

Der Mittelwert der Überlebensrate vor dem Transport betrug  $98,52\% \pm 0,81\%$ , wohingegen der Mittelwert der Überlebensrate nach dem Transport bei  $97,33\% \pm 2,50\%$  lag. Die inferenzstatistische Analyse ergab nach Berechnung eines Wilcoxon-Tests keinen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten,  $Z = -1,07$  und  $p = 0,500$ .

Somit konnte der Effekt des Transports bei der Interpretation der Überlebensraten als nicht relevant eingeschätzt werden, weshalb ein potenzieller Transporteffekt nicht bei der Berechnung der Überlebensraten korrigiert wurde.

#### 4.4. Relative Überlebensrate

Ein anderer Parameter, anhand dessen die Kryokonservierung evaluiert werden kann, ist die relative Überlebensrate. Die relative Überlebensrate beschreibt das Verhältnis zwischen der Gesamtzahl der lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung und der Gesamtzahl an Zellen, die nach der Kryokonservierung wiedergefunden wurden. Demnach beleuchtet die relative Überlebensrate lediglich den Zustand nach der Kryokonservierung, ohne einen Bezug zum Zustand vor dem Einfrieren herzustellen. Erneut wurde hier ein Kruskal-Wallis-Test für jeden Zeitpunkt berechnet. Da zwei Tests mit abhängigen Daten berechnet wurden, wurde zur Kontrolle des  $\alpha$ -Fehlers eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend auf  $\alpha = 0,025$  angepasst. Ergebnisse mit  $p < 0,025$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Abbildung 13 veranschaulicht die mittleren relativen Überlebensraten:

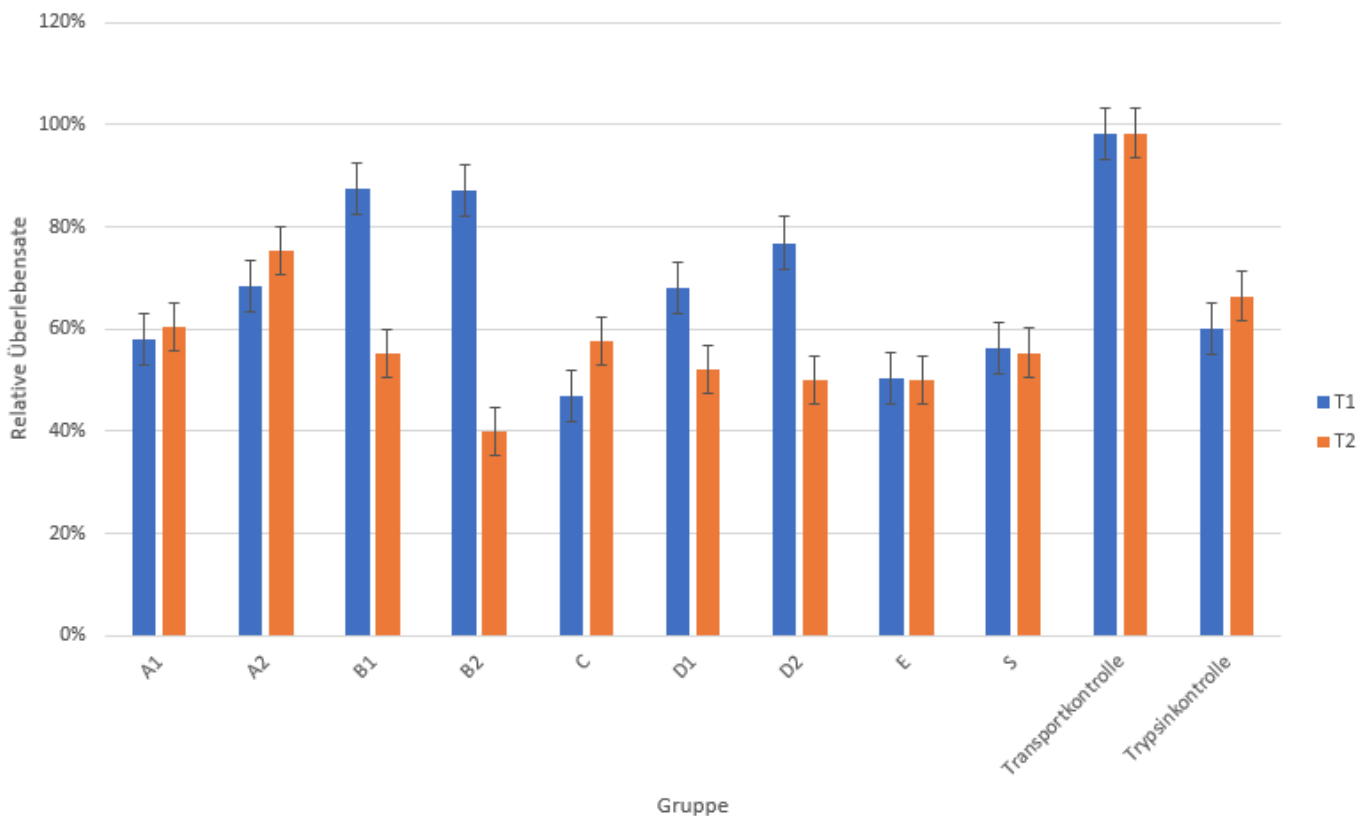


Abbildung 13: Darstellung der mittleren relativen Überlebensrate  $S_{\text{relativ}}$  der hiPSCs

Die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen den gepoolten Standardfehler des Mittelwertes pro Zeitpunkt.

Auch die relative Überlebensrate variierte in ihrem Ausmaß bei Betrachtung der verschiedenen Gruppen. Die durchschnittliche relative Überlebensrate betrug für alle Gruppen zum Zeitpunkt T1  $68,85\% \pm 16,62\%$ . Zum Zeitpunkt T2 fiel die durchschnittliche relative Überlebensrate aller Gruppen auf  $60,08\% \pm 15,73\%$  ab. Dabei sollte differenziert werden, dass sich für die Gruppen

A1, A2, C, Transportkontrolle und Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T2 eine Erhöhung der relativen Überlebensrate im Vergleich zum Zeitpunkt T1 beobachten ließ. Die höchste Mittelwertdifferenz zwischen den Zeitpunkten wies die Gruppe B2 mit einer Differenz von 47,04% auf, wohingegen die niedrigste Mittelwertdifferenz die Gruppe Transportkontrolle mit 0,12% aufzeigte.

In der Trypsinkontrollgruppe lag eine durchschnittliche relative Überlebensrate von 60,06%  $\pm$  4,21% zum Zeitpunkt T1 und 66,45%  $\pm$  3,96% zum Zeitpunkt T2 vor.

Die Gruppe S wies zum Zeitpunkt T1 eine relative Überlebensrate von 56,10%  $\pm$  6,06% auf, wohingegen diese zum Zeitpunkt T2 bei 55,37%  $\pm$  5,04% lag.

Unter den kryokonservierten Gruppen wies die höchste relative Überlebensrate zum Zeitpunkt T1 die Gruppe B1 mit 87,55%  $\pm$  1,34% und zum Zeitpunkt T2 die Gruppe A2 mit 75,33%  $\pm$  4,21% auf. Die niedrigste relative Überlebensrate konnte bei der Gruppe C mit 46,87%  $\pm$  3,93% zum Zeitpunkt T1 und bei der Gruppe B2 mit 40,03%  $\pm$  11,04% zum Zeitpunkt T2 festgestellt werden.

Um herauszufinden, ob sich die relativen Überlebensraten signifikant voneinander unterschieden, wurde für jeden Zeitpunkt ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Dieser ergab einen signifikanten Unterschied der relativen Überlebensraten zum Zeitpunkt T1 mit  $H(10)=30,103$  und  $p < 0,001$  sowie zum Zeitpunkt T2  $H(10)=27,965$  und  $p = 0,002$ .

Die Dunn-Post-hoc-Vergleiche wurden im Rahmen einer explorativen Analyse durchgeführt. Zur Reduktion des  $\alpha$ -Fehlers bei zwei Zeitpunkten wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0,025$  angepasst. Eine weitergehende Korrektur über alle paarweisen Tests hinweg wurde nicht vorgenommen, um potenziell relevante Unterschiede nicht zu übersehen und einen möglichen Anstieg des Fehlers 2. Art bei kleiner Fallzahl zu vermeiden. Entsprechend wurden  $p$ -Werte  $< 0,025$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

Werden die Gruppen A1 (MW= 59,12%  $\pm$  2,29%), A2 (MW= 71,83%  $\pm$  3,45%) und C (MW= 52,21%  $\pm$  4,50%) jeweils mit den Gruppen B1 (71,41%  $\pm$  1,52%), B2 (MW= 63,55%  $\pm$  7,07%), D1 (MW= 60,05%  $\pm$  4,90%), D2 (MW= 63,44%  $\pm$  4,81%) und E (MW= 50,17%  $\pm$  2,53%) verglichen, so kann die Kryokonservierung von Einzelzellsuspensionen mit der Kryokonservierung von 3D-Aggregaten verglichen werden. Bei den in den Klammern angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den Mittelwert der relativen Überlebensrate über beide Zeitpunkte hinweg. Die Kryokonservierung jeder Gruppe wurde drei Mal ( $n=3$ ) wiederholt. Folglich wurde die relative Überlebensrate für jede Gruppe ebenfalls drei Mal bestimmt.

Die paarweisen Vergleiche der Gruppe A1 zeigten, dass lediglich zur Gruppe B2 zum Zeitpunkt T2 ein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,020$  bestand, wobei die Gruppe A1 hierbei den höheren Wert aufwies.

Die paarweisen Vergleiche der Gruppe A2 zeigten, dass lediglich zum Zeitpunkt T2 signifikante Unterschiede zu den Gruppen B2, D2 und E mit  $p \leq 0,006$  bestanden. Dabei handelte es sich bei der relativen Überlebensrate der Gruppe A2 um den jeweils höheren Wert. Die paarweisen Vergleiche der Gruppe C hingegen verdeutlichten, dass zum Zeitpunkt T2 keine signifikanten Unterschiede bestanden. Zum Zeitpunkt T1 dahingegen zeigte sich, dass signifikante Unterschiede zu den Gruppen B1, B2 und D2 mit  $p \leq 0,018$  bestanden. Dabei stellte die relative Überlebensrate der Gruppe C den jeweils niedrigeren Wert dar.

Möchte man die Einzelzellen differenzierter analysieren, so bietet sich der Vergleich zwischen den Gruppen A1 und A2 mit der Gruppe C an. Die paarweisen Vergleiche zeigten jedoch mit  $p > 0,025$  keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man das Säulendiagramm, so ließ sich die Tendenz beobachten, dass die Gruppen A1 und A2 zu beiden Zeitpunkten eine höhere relative Überlebensrate als die Gruppe C aufwiesen. Dabei betrug die Mittelwertdifferenz zwischen der Gruppe A1 und C über beide Zeitpunkte hinweg 6,91% und zwischen A2 und C sogar 19,61%.

Ebenso konnten die dreidimensionalen Aggregate näher analysiert werden. Dabei illustrierte der Vergleich der Gruppen B1 und B2 mit den Gruppen D1 und D2, dass keine signifikanten Unterschiede in den paarweisen Vergleichen mit  $p > 0,025$  festzustellen waren. Beobachtet werden konnte, dass über beide Zeitpunkte hinweg die relative Überlebensrate der Gruppe B1 höher war als für die Gruppen D1 und D2. Dabei betrug die Mittelwertdifferenz über beide Zeitpunkte hinweg zur Gruppe D1 11,36% und zur Gruppe D2 7,97%. Für die Gruppe B2 konnten über beide Zeitpunkte hinweg ebenso leicht höhere relative Überlebensraten beobachtet werden. Die Mittelwertdifferenz über beide Zeitpunkte hinweg betrug zur Gruppe D1 3,50% und zur Gruppe D2 0,11%.

Wurden die Trypsinierung und die Filterung der Zellen miteinander verglichen, so präsentierte der Vergleich zwischen den Gruppen B1 und B2 sowie D1 und D2, dass in den paarweisen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden konnten. Beobachten ließ sich jedoch, dass die Gruppe B1 über beide Zeitpunkte hinweg betrachtet eine höhere relative Überlebensrate mit einer Mittelwertdifferenz von 7,86% zur Gruppe B2 aufwies. Dahingegen zeigte sich, dass das Gegenteil für die Gruppen D1 und D2 der Fall war. Hierbei ließ sich eine höhere relative Überlebensrate über beide Zeitpunkte hinweg für die Gruppe D2 mit einer Mittelwertdifferenz von 3,39% beobachten.



Für die Gruppen A1 und A2 (verschiedene Einfriermedien) konnte deskriptiv mit einer Mittelwertdifferenz von 12,71% eine höhere Überlebensrate bei der Gruppe A2 festgestellt werden, jedoch kein signifikanter Unterschied bei den paarweisen Vergleichen ( $p > 0,025$ ).

Zum Vergleich der verschiedenen Auftautemperaturen wurden die Gruppen D1 und E miteinander verglichen. Über beide Zeitpunkte hinweg verzeichneten die Gruppen eine Mittelwertdifferenz von 9,88%, wobei die Gruppe D1 den jeweils höheren Wert stellte. Dahingegen konnte jedoch keine signifikante Differenz der relativen Überlebensraten zu beiden Zeitpunkten festgestellt werden.

Insgesamt zeigte sich kein konsistentes Muster signifikanter Gruppenunterschiede. Hervorzuheben ist jedoch die beobachtete, hohe relative Überlebensrate der Gruppen B1 und B2 zum Zeitpunkt T1.

#### **4.5. Wiederfindungsrate**

Die Wiederfindungsrate beschreibt das Verhältnis der gezählten Zellen nach dem Auftauen und der Gesamtzahl der gezählten Zellen vor der Kryokonservierung. Da eine hohe Zellausbeute für die Kryokonservierung wichtig ist, stellt die Wiederfindungsrate einen nicht zu vernachlässigenden Parameter bei der Bewertung der Kryokonservierung dar. Für jeden Zeitpunkt wurde ein Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der Wiederfindungsraten zwischen den Gruppen berechnet. Da zwei Tests mit abhängigen Daten berechnet wurden, wurde zur Kontrolle des  $\alpha$ -Fehlers eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend auf  $\alpha = 0,025$  angepasst. Ergebnisse mit  $p < 0,025$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Eine Veranschaulichung der mittleren Wiederfindungsrate kann der Abbildung 14 entnommen werden:

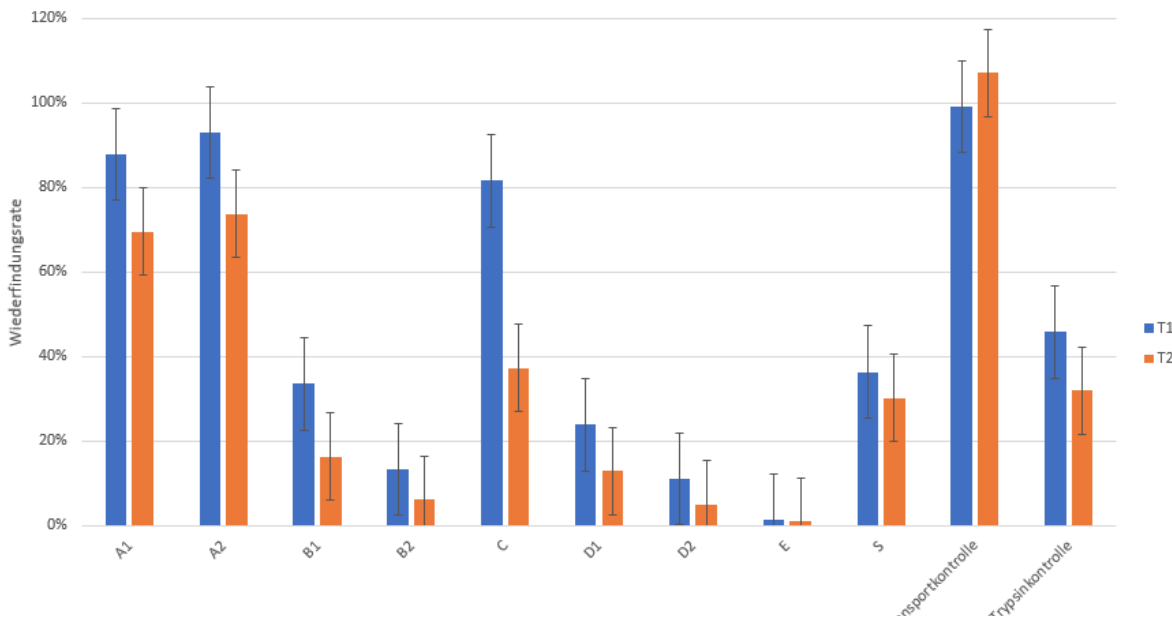


Abbildung 14: Darstellung der mittleren Wiederfindungsrate der hiPSCs

Die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen den gepoolten Standardfehler des Mittelwertes pro Zeitpunkt.

Insgesamt konnten für alle Gruppen zu T1 eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von  $47,86\% \pm 35,36\%$  und zu T2 eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von  $35,51\% \pm 33,30\%$  festgestellt werden.

Ausgenommen von der Transportkontrollgruppe wies die höchste Wiederfindungsrate die Gruppe A2 mit  $92,99\% \pm 2,56\%$  zum Zeitpunkt T1 und für T2 ebenfalls die Gruppe A2 mit  $73,74\% \pm 11,92\%$  auf. Die niedrigste Wiederfindungsrate konnte zu beiden Zeitpunkten bei der Gruppe E mit  $1,24\% \pm 0,46\%$  für T1 und  $0,93\% \pm 0,19\%$  für T2 festgestellt werden.

Nach alleiniger Trypsinierung konnte ebenfalls eine verminderte Wiederfindungsrate von  $45,71\% \pm 9,17\%$  für T1 und  $31,87\% \pm 3,00\%$  für T2 ermittelt werden.

Die Gruppe S wies eine Wiederfindungsrate von  $36,34\% \pm 13,79\%$  zu T1 und  $30,12\% \pm 9,54\%$  zu T2 auf.

Die Wiederfindungsrate lag für die Transportkontrollgruppe bei T2 mit  $107,03\% \pm 2,14\%$  über 100%, da die Zellen nach der Messung bei T1 mit  $99,05\% \pm 0,58\%$  weiter proliferierten.

Zudem konnte beobachtet werden, dass die Wiederfindungsrate mit Ausnahme der Transportkontrollgruppe für alle anderen Gruppen zum Zeitpunkt T2 niedriger war als zum Zeitpunkt T1. Dies deckte sich mit den bisher beschriebenen Ergebnissen der absoluten Überlebensrate (siehe 4.2). Die höchste Mittelwertdifferenz zwischen beiden Zeitpunkten zeigte die Gruppe C mit  $44,36\%$  und die niedrigste Mittelwertdifferenz wies die Gruppe E mit  $0,30\%$  auf.

Um zu überprüfen, ob sich die durchschnittlichen Wiederfindungsraten zwischen den Gruppen unterschieden, wurde für jeden Zeitpunkt ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Dieser ergab für den Zeitpunkt T1, dass zwischen einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied bestand,  $H(10) = 30,838$  und asymptotisches  $p < 0,001$ . Für den Zeitpunkt T2 konnte ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Gruppen festgestellt werden,  $H(10) = 31,28$  und asymptotisches  $p < 0,001$ .

Die Dunn-Post-hoc-Vergleiche wurden im Rahmen einer explorativen Analyse durchgeführt. Zur Reduktion des  $\alpha$ -Fehlers bei zwei Zeitpunkten wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0,025$  angepasst. Eine weitergehende Korrektur über alle paarweisen Tests hinweg wurde nicht vorgenommen, um potenziell relevante Unterschiede nicht zu übersehen und einen möglichen Anstieg des Fehlers 2. Art bei kleiner Fallzahl zu vermeiden. Entsprechend wurden  $p$ -Werte  $< 0,025$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

Die paarweisen Vergleiche zwischen den Gruppen A1 (MW= 78,64%  $\pm$  2,45%), A2 (MW= 83,37%  $\pm$  7,24%) und C (MW= 59,39%  $\pm$  5,77%) mit jeweiligen Gruppen B1 (24,93%  $\pm$  4,23%), B2 (MW= 9,69%  $\pm$  1,37%), D1 (MW= 18,38%  $\pm$  3,25%), D2 (MW= 7,97%  $\pm$  1,95%) und E (MW= 1,09%  $\pm$  0,33%) erlaubten eine Analyse zwischen Einzelzellsuspensionen und dreidimensionalen Aggregaten. Bei den in den Klammern angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den Mittelwert der Wiederfindungsrate über beide Zeitpunkte hinweg. Die Kryokonservierung jeder Gruppe wurde drei Mal ( $n=3$ ) wiederholt, sodass die Wiederfindungsrate für jede Gruppe ebenfalls drei Mal bestimmt wurde.

Die Ergebnisse deckten sich hierbei größtenteils mit jenen zu den absoluten Überlebensraten. Zunächst ließ sich beobachten, dass die Wiederfindungsraten der Einzelzellsuspensionen zu je beiden Zeitpunkten höher lagen als die Wiederfindungsraten der 3D-Aggregate. Die Analyse ergab, dass die Gruppen A1, A2 und C zum Zeitpunkt T1 eine signifikant höhere Wiederfindungsrate aufwiesen als die Gruppen D2 und E mit  $p \leq 0,014$ . Für T2 galt dies ebenfalls ( $p \leq 0,009$ ), mit Ausnahme des Vergleichs zwischen C und D2, der keine signifikante Differenz zeigte.

Die paarweisen Vergleiche der Gruppen A1, A2 und C zu den Gruppen B1 und D1 ergaben mit  $p > 0,025$  keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise zeigte der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen A2 und B2, dass die Wiederfindungsrate der Gruppe A2 zu beiden Zeitpunkten mit  $p \leq 0,009$  signifikant höher war als jene der Gruppe B2. Beim Vergleich der Gruppen A1 und B2 zeigte sich, dass zum Zeitpunkt T1 keine signifikant höhere Wiederfindungsrate der Gruppe A1 vorlag. Dahingegen zeigte der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen A1 und B2 zu T2, dass die Gruppe A1 eine signifikant höhere

Wiederfindungsrate mit  $p = 0,011$  aufwies. Der Vergleich zwischen den Gruppen C und B2 ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied mit  $p > 0,025$ .

Möchte man die Einzelzellsuspensionen differenzierter miteinander vergleichen, so konnte illustriert werden, dass sich die Wiederfindungsraten der Gruppen A1 und A2 zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant von jenen der Gruppe C mit  $p > 0,025$  unterschieden. Erwähnenswert ist jedoch, dass über beide Zeitpunkte hinweg die Mittelwertdifferenz zwischen den Gruppen A1 und C bei 19,25% und zwischen A2 und C sogar bei 23,98% lag, wobei die Gruppe C den jeweils niedrigen Wert repräsentierte.

Bei näherer Betrachtung der dreidimensionalen Aggregate fiel auf, dass die paarweisen Vergleiche der Gruppen B1 und B2 mit den Gruppen D1 und D2 keine signifikant höheren Wiederfindungsraten zeigten. Nichtsdestotrotz konnte durch Betrachtung der Säulendiagramme festgestellt werden, dass zu je beiden Zeitpunkten die Wiederfindungsrate der Gruppe B1 höher war als jene der Gruppe D1. Die Mittelwertdifferenz über beide Zeitpunkte hinweg betrug 6,55%. Durch den deskriptiven Vergleich zwischen den Gruppen B2 und D2 konnte ebenso observiert werden, dass die Gruppe B2 eine leicht höhere Wiederfindungsrate mit einer Mittelwertdifferenz von 1,72% über T1 und T2 hinweg aufwies. Wurden die Gruppen B2 und D1 miteinander verglichen, so beobachtete man, dass bei einer Mittelwertdifferenz von 8,69% die Gruppe D1 über beide Zeitpunkte hinweg eine höhere Wiederfindungsrate aufwies.

Um die Methode der Filterung mit der Methodik der Trypsinierung zu vergleichen, wurden die Gruppen B1 und D1 mit den Gruppen B2 und D2 verglichen. Es konnte beobachtet werden, dass gefilterte Zellen eine höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen, wiedergefunden zu werden. Dies spiegelte sich in der Mittelwertdifferenz zwischen den Gruppen B1 und B2 von 15,23% über beide Zeitpunkte hinweg wider. Auch für die Gruppen D1 und D2 konnte dies bestätigt werden. Hier betrug die Mittelwertdifferenz über beide Zeitpunkte hinweg 10,41%. Die Analyse konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied mit  $p > 0,025$  feststellen.

Möchte man die verschiedenen Einfriermedien vergleichen, so konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die Wiederfindungsrate über beide Zeitpunkte hinweg für die Gruppe A2 höher war als für die Gruppe A1. Dies konnte durch eine Mittelwertdifferenz von 4,72% bestätigt werden. Einen signifikanten Unterschied konnte man in der Auswertung jedoch nicht feststellen.

Beim Vergleich der Auftautemperaturen zeigte sich, dass über beide Zeitpunkte hinweg eine Mittelwertdifferenz von 17,30% zwischen den Gruppen D1 und E vorlag, wobei die Gruppe E den niedrigeren Wert stellte. Ein signifikanter Unterschied konnte durch eine Analyse mit  $p > 0,025$  jedoch nicht bestätigt werden.

Nach Beobachtung der Wiederfindungsrate konnte zusammengefasst werden, dass die Wiederfindungsrate der Einzelzellen höher war als die Wiederfindungsrate der 3D-Aggregate. Für Einzelzellen, die nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden, ließ sich eine höhere Wiederfindungsrate beobachten als für Einzelzellen, die nach dem gynäkologischen Protokoll eingefroren und aufgetaut wurden. Für alle kryokonservierten Gruppen konnte außerdem ein Abfall der Wiederfindungsrate 24h nach der Kryokonservierung beobachtet werden.

#### **4.6. Adaptierte Überlebensrate**

Die adaptierte Überlebensrate beschreibt das Verhältnis aus den lebendigen Zellen 24h nach der Kryokonservierung und der Summe aus der Gesamtzahl der wiedergefundenen Zellen 24h nach der Kryokonservierung sowie der Gesamtzahl an nicht-wiedergefundenen Zellen nach der Kryokonservierung zum Zeitpunkt T2. Die adaptierte Überlebensrate wurde eingeführt, damit nicht-wiedergefundenen Zellen zum Zeitpunkt T2 berücksichtigt werden konnten. Somit korrigiert die adaptierte Überlebensrate die relative Überlebensrate, da bei der adaptierten Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 die nicht-wiedergefundenen Zellen als tot gewertet werden. Die Berücksichtigung der adaptierten Überlebensrate ist wichtig, da so die Evaluation der Kryokonservierung in einen realistischeren Bereich verschoben wird und die Bewertung der relativen Überlebensrate nicht zu positiv ausfällt.

Abbildung 15 zeigt die mittlere adaptierte Überlebensrate graphisch:

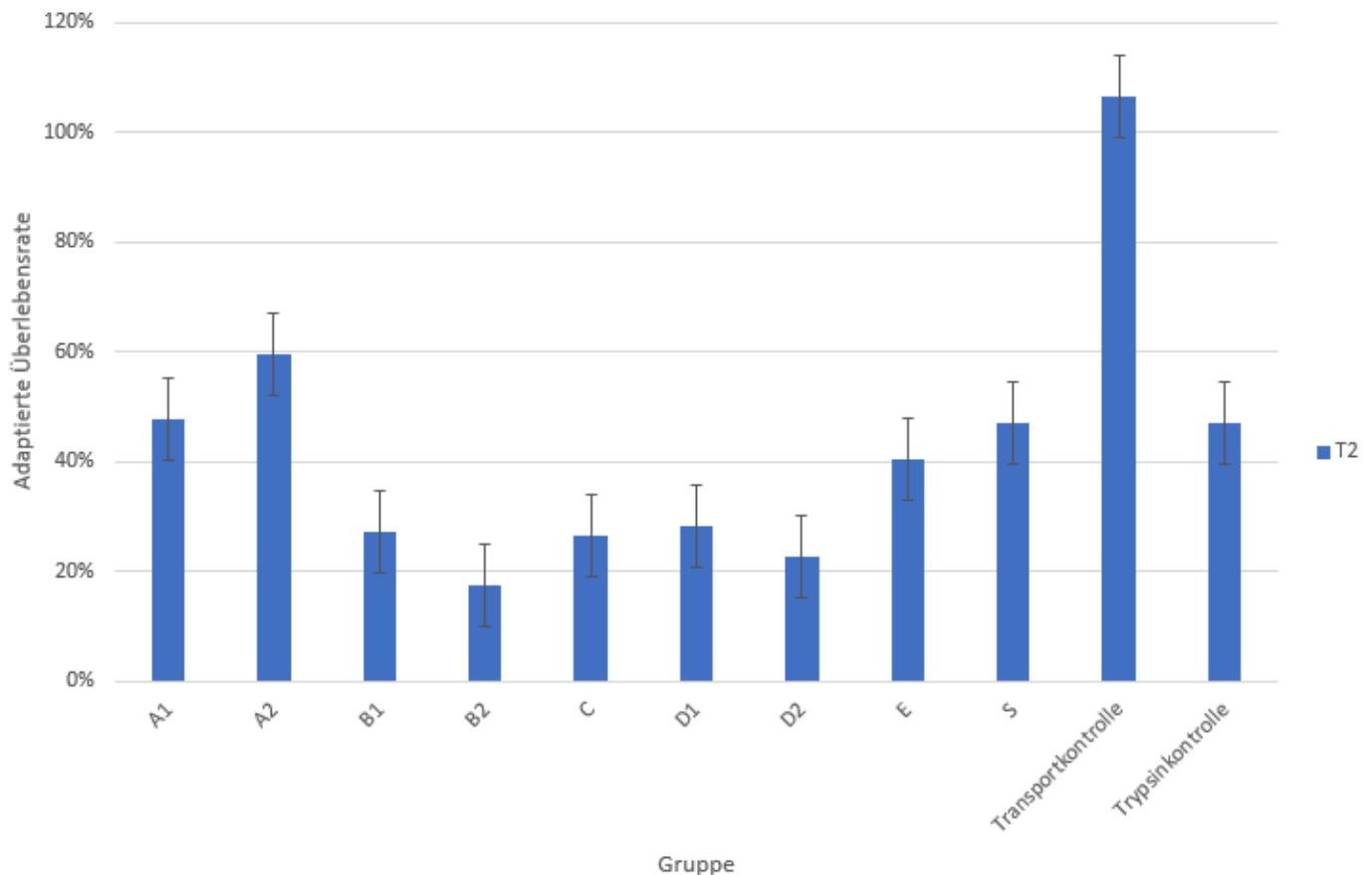


Abbildung 15: Darstellung der mittleren adaptierten Überlebensrate  $S_{\text{adaptiert}}$  der hiPSCs

Die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen den gepoolten Standardfehler des Mittelwertes pro Zeitpunkt.

Insgesamt konnte eine adaptierte Überlebensrate von  $42,76\% \pm 24,60\%$  zum Zeitpunkt T2 festgestellt werden. Dabei zeigte sich eine große Variabilität zwischen den Gruppen. Die durchschnittlich höchste adaptierte Überlebensrate wies die Gruppe Transportkontrolle mit  $106,38\% \pm 2,89\%$  auf. Die adaptierte Überlebensrate lag somit über 100%, da die Zellen unmittelbar nach dem Auftauen weiter proliferierten. Mit Ausnahme der Transportkontrollgruppe lag unter den kryokonservierten Gruppen die durchschnittlich höchste adaptierte Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 bei Gruppe A2 mit  $59,40\% \pm 6,5\%$  vor. Die durchschnittlich niedrigste adaptierte Überlebensrate wies die Gruppe B2 mit  $17,41\% \pm 4,68\%$  auf.

Wichtig zu erwähnen ist, dass nach alleiniger Trypsinierung in der Trypsinkontrollgruppe eine adaptierte Überlebensrate von  $47,19\% \pm 7,79\%$  verzeichnet wurde.

Die Gruppe S wies eine adaptierte Überlebensrate von durchschnittlich  $47,12\% \pm 8,13\%$  auf.

Um zu überprüfen, ob sich die durchschnittlichen adaptierten Überlebensraten zwischen den Gruppen unterscheiden, wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Dieser ergab, dass

zwischen einzelnen Gruppen ein signifikanter Unterschied bestand,  $H(10) = 27,38$  und asymptotisches  $p = 0,002$ .

Um zu testen, welche Gruppen sich unterscheiden, wurden paarweise Dunn-Post-hoc-Tests gerechnet. Die nachfolgenden paarweisen Post-hoc-Vergleiche wurden im Rahmen einer explorativen Analyse durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an Vergleichspaarungen, die sich aus den insgesamt 11 Gruppen ergeben, wurde im Rahmen der explorativen Analyse bewusst auf eine zusätzliche Korrektur der  $\alpha$ -Fehlerrate verzichtet. Dies erfolgte außerdem, um trotz kleiner Fallzahlen einen potenziellen Anstieg des Fehlers 2. Art zu vermeiden und potenziell relevante Unterschiede nicht zu übersehen. Entsprechend wurden  $p$ -Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

Wurden kryokonservierte Einzelzellsuspensionen (Gruppen A1: MW= 47,73%  $\pm$  2,13%; A2: MW= 59,40%  $\pm$  6,50%; C: MW= 26,48%  $\pm$  3,66%) mit den dreidimensionalen Aggregaten verglichen (Gruppe B1: MW= 27,09%  $\pm$  1,65%; B2: MW= 17,41%  $\pm$  4,68%; D1: MW= 28,28%  $\pm$  2,12%; D2: MW= 22,70%  $\pm$  9,03%; E: MW= 40,57%  $\pm$  11,85%), so zeigte sich, dass nicht alle kryokonservierten Einzelzellsuspensionen signifikant besser überlebten als 3D-Aggregate. Bei den in Klammern angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den Mittelwert der adaptierten Überlebensrate zum Zeitpunkt T2. Die Kryokonservierung jeder Gruppe wurde drei Mal ( $n=3$ ) wiederholt. Folglich wurde die adaptierte Überlebensrate für jede Gruppe drei Mal bestimmt.

Lediglich die Gruppe A2 wies mit  $p < 0,043$  eine signifikant höhere adaptierte Überlebensrate auf als die dreidimensionalen Aggregate. Davon ausgenommen ist der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen A2 und E. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Gruppe C fiel unter den kryokonservierten Einzelzellen durch eine generell niedrige adaptierte Überlebensrate auf. Auch die paarweisen Vergleiche der Gruppe C mit den Gruppen B1, B2, D1, D2 und E ergaben keinen signifikanten Unterschied. Die Gruppe A1 wies im Vergleich zur Gruppe B2 mit  $p = 0,014$  eine signifikant erhöhte adaptierte Überlebensrate auf. Die paarweisen Vergleiche der Gruppe A1 zu den Gruppen B1, D1, D2 und E ergaben keinen signifikanten Unterschied.

Die Gruppe A2 hatte im Vergleich zur Gruppe C eine signifikant höhere adaptierte Überlebensrate ( $p = 0,014$ ). Der Vergleich zwischen den Gruppen A1 und C ergab keinen signifikanten Unterschied.

In den paarweisen Vergleichen zwischen den kryokonservierten dreidimensionalen Aggregaten aus der Gynäkologie (Gruppen D1 und D2) und den dreidimensionalen

Aggregaten, welche nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden (Gruppen B1 und B2), konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Gruppe B1 wies im Vergleich zur Gruppe B2 eine nicht signifikant höhere adaptierte Überlebensrate mit einer Mittelwertdifferenz von  $9,68\% \pm 7,90\%$  auf.

Ebenfalls ergab der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen D1 und D2 trotz einer Mittelwertdifferenz von  $5,58\% \pm 7,90\%$  keinen signifikanten Unterschied. Dabei wies die Gruppe D1 den jeweils höheren Wert auf.

Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Gruppen A1 und A2 trotz einer Mittelwertdifferenz von  $11,67\% \pm 7,90\%$  festgestellt werden, wobei die Gruppe A2 den jeweils höheren Wert stellte.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Gruppe E eine höhere adaptierte Überlebensrate als die Gruppe D1 mit einer Mittelwertdifferenz von  $12,29\% \pm 7,90\%$  aufwies. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant und bei der Interpretation sollte bedacht werden, dass die Wiederfindungsrate und die absolute Überlebensrate für die Gruppe E generell sehr niedrig waren.

Resümierend kann konstituiert werden, dass kein regelmäßiges Muster der Signifikanzverteilung erkannt werden konnte. Besonders hervorzuheben war die hohe adaptierte Überlebensrate der Gruppe A2 sowie die Beobachtung, dass Einzelzellen, die nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden, eine höhere adaptierte Überlebensrate aufwiesen als jene Einzelzellen, die nach dem gynäkologischen Protokoll kryokonserviert wurden.

#### **4.7. Korrigierte Überlebensrate und $T_{eff}$**

Die korrigierte Überlebensrate gibt das Verhältnis zwischen lebendigen Zellen nach der Kryokonservierung und Trypsinisierung und jenen Zellen, die nicht durch die Trypsinisierung geschädigt wurden, wieder. Um zu überprüfen, ob die Inkubation der Zellen mit Trypsin einen Einfluss auf das Zellüberleben hatte, wurde die Trypsinkontrollgruppe eingeführt. Dazu wurden Zellen im Labor der Physiologie analysiert, mit Trypsin inkubiert und nach Stoppen der Reaktion erneut analysiert. So diente die Basis Überlebensrate als Ausgangswert vor dem Trypsinieren. Dahingegen stellt die absolute Überlebensrate die Überlebensrate nach dem Trypsinieren bei den trypsinierten Gruppen dar. Demnach konnte durch die korrigierte Überlebensrate der alleinige Effekt der Kryokonservierung auf die 3D-Aggregate betrachtet werden, welche mit Trypsin enzymatisch dissoziiert wurden.



Um beide Werte der korrigierten Überlebensrate miteinander zu vergleichen, wurde ein Wilcoxon-Test berechnet.

Folglich wird die mittlere korrigierte Überlebensrate in Abbildung 16 dargestellt:

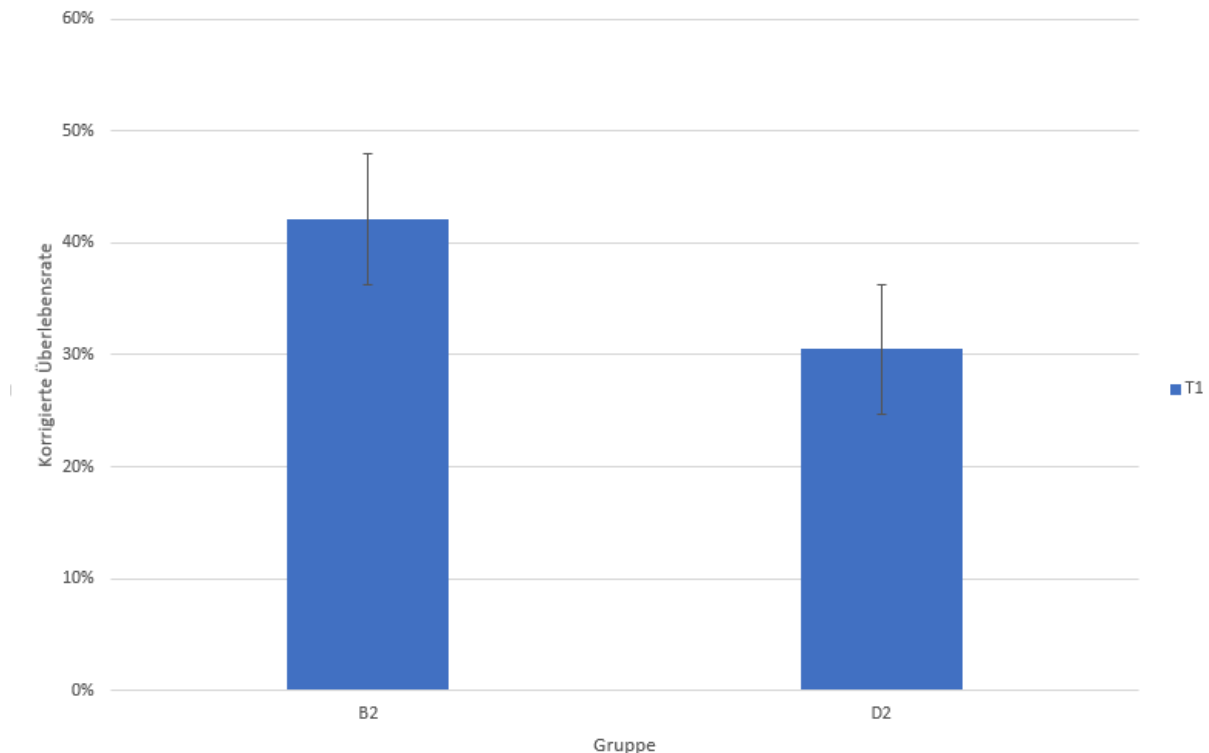


Abbildung 16: Darstellung der mittleren korrigierten Überlebensrate  $S_{\text{korrigiert}}$  der hiPSCs

Die Fehlerbalken in der Abbildung zeigen den gepoolten Standardfehler des Mittelwertes pro Zeitpunkt.

Der Mittelwert der Überlebensrate der Trypsinkontrollgruppe vor der Inkubation mit Trypsin betrug  $94,30\% \pm 0,84\%$ , wohingegen der Mittelwert der absoluten Überlebensrate nach Hinzufügen des Trypsins in der Trypsinkontrollgruppe bei  $27,53\% \pm 6,54\%$  lag. Der Wilcoxon-Test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den trypsinisierten und nicht-trypsinisierten Zellen in der Trypsinkontrollgruppe,  $Z = -1,60$  und  $p = 0,125$ . Aufgrund der hohen Mittelwertdifferenz von  $66,77\%$  und der kleinen Stichprobengröße mit  $n=3$  je Gruppe liegt die Vermutung nahe, dass aufgrund der geringen Teststärke der Unterschied nicht gefunden werden konnte.

Da ein zytotoxischer Effekt des Trypsins auf das Zellüberleben, die Funktionalität der Zelle sowie die Expression gewisser Oberflächenmarker beschrieben wurde, stützt dies die Annahme, dass die Trypsinierung einen Effekt auf das Zellüberleben in dieser Experimentreihe hatte.<sup>160,163</sup> Demnach scheint es trotzdem sinnvoll, die korrigierte Überlebensrate einzuführen, welche einen Unterschied im Zellüberleben nach der Trypsinierung voraussetzt.

Nach Bestimmung des Mittelwerts konnte ein durchschnittlicher Trypsinierungseffekt  $T_{\text{eff}} = 0,275 \pm 0,07$  festgestellt werden (siehe 3.2.15).

Um den Unterschied zwischen den korrigierten Überlebensraten der Gruppen B2 und D2 zu analysieren, wurde ein Mann-Whitney-U-Test berechnet. Die durchschnittliche korrigierte Überlebensrate für beide Gruppen betrug insgesamt  $36,31\% \pm 7,04\%$ . Für die Gruppe B2 konnte eine korrigierte Überlebensrate von  $42,13\% \pm 1,82\%$  und für die Gruppe D2  $30,49\% \pm 3,41\%$  beobachtet werden.

Zur Überprüfung der Voraussetzungen wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei unabhängigen Stichproben berechnet. Dieser ergab, dass sich die Verteilungen der beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden,  $p = 0,996$ .

Es konnte festgestellt werden, dass sich die korrigierten Überlebensraten der beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden,  $U = 0$  sowie  $Z = -1,96$  und  $p = 0,050$ .

Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Trypsinierung einen Effekt auf das Zellüberleben hatte, sodass die Einführung der korrigierten Überlebensrate sinnvoll erschien. Außerdem ergab die Auswertung, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den korrigierten Überlebensraten der Gruppen B2 und D2 bestand.

#### **4.8. Proliferationsrate**

Die Proliferationsrate setzt die Differenz aus den lebendigen Zellen 24h nach der Kryokonservierung und den lebendigen Zellen direkt nach der Kryokonservierung mit den lebendigen Zellen direkt nach der Kryokonservierung ins Verhältnis zueinander. Demnach berücksichtigt die Proliferationsrate einen längerfristigen, dynamischen Effekt der Kryokonservierung auf die hiPSCs.

So kann die mittlere Proliferationsrate graphisch folgendermaßen in Abbildung 17 dargestellt werden:

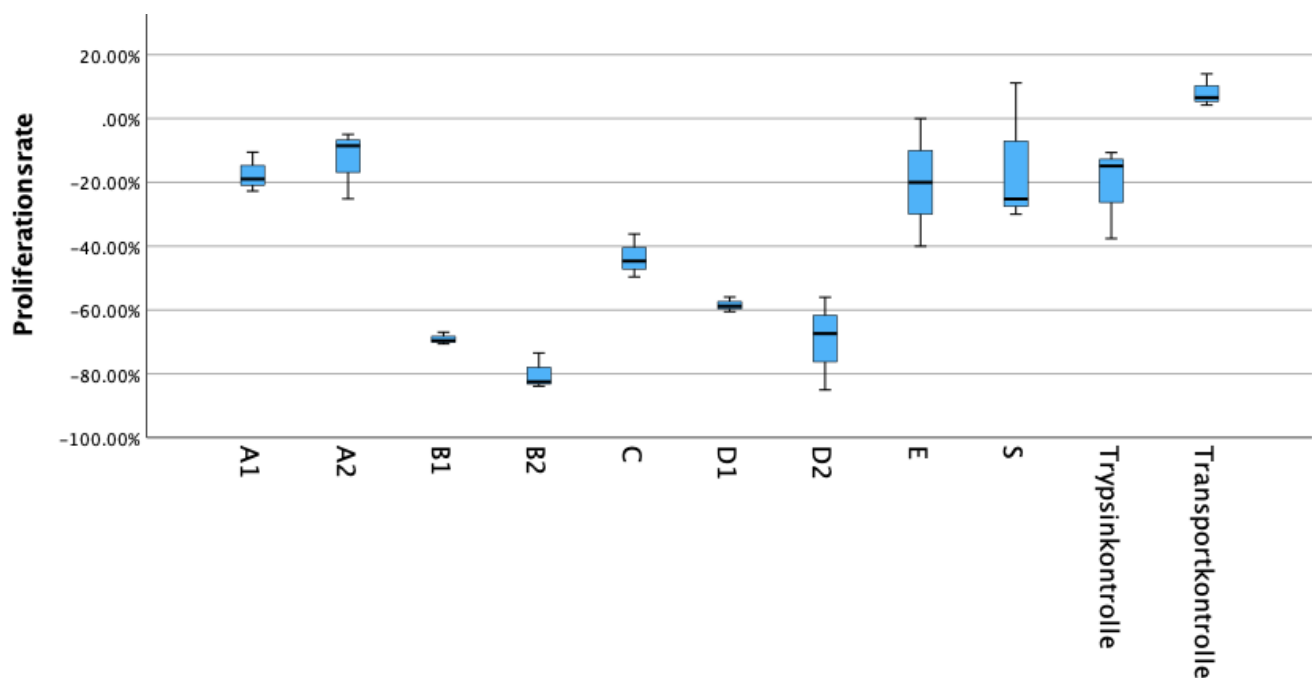


Abbildung 17: Darstellung der mittleren Proliferationsrate der hiPSCs

Insgesamt betrug die durchschnittliche Proliferationsrate aller Gruppen  $-36,20\% \pm 29,91\%$ . Generell konnte beobachtet werden, dass lediglich die Transportkontrollgruppe eine positive Proliferationsrate mit  $8,26\% \pm 5,09\%$  aufwies. Die restlichen Gruppen zeigten alle eine negative Proliferationsrate auf. Die niedrigste Proliferationsrate wies die Gruppe B2 mit  $-79,95\% \pm 5,65\%$  auf. Eine Proliferationsrate von  $-79,95\% \pm 5,65\%$  bedeutet, dass die Zellzahl der Gruppe B2 24h nach der Kryokonservierung im Vergleich zum Zeitpunkt T1 um  $-79,95\% \pm 5,65\%$  abnahm. Die Mittelwertdifferenz zwischen der durchschnittlich höchsten und niedrigsten Proliferationsrate betrug somit  $88,21\% \pm 7,90\%$ .

Unter den kryokonservierten Gruppen wies die höchste Proliferationsrate die Gruppe A2 mit  $-12,89\% \pm 10,75\%$  auf.

Nach Trypsinierung wiesen die Zellen der Trypsinkontrollgruppe bereits eine negative Proliferationsrate mit  $-21,07\% \pm 14,49\%$  auf.

Gruppe S wies eine Proliferationsrate von durchschnittlich  $-14,70\% \pm 22,48\%$  auf.

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Gruppen sich in der durchschnittlichen Proliferationsrate unterscheiden, wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. Der Test ergab, dass einzelne Gruppen sich in ihrer Proliferationsrate unterschieden,  $H(10) = 27,78$  und  $p = 0,002$ .

Um zu testen, welche Gruppen sich unterscheiden, wurden paarweise Dunn-Post-hoc-Tests gerechnet. Die nachfolgenden paarweisen Post-hoc-Vergleiche wurden im Rahmen einer explorativen Analyse durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl an Vergleichspaarungen, die sich

aus den insgesamt 11 Gruppen ergeben, wurde im Rahmen der explorativen Analyse bewusst auf eine zusätzliche Korrektur der  $\alpha$ -Fehlerrate verzichtet. Dies erfolgte außerdem, um trotz kleiner Fallzahlen einen potenziellen Anstieg des Fehlers 2. Art zu vermeiden und potenziell relevante Unterschiede nicht zu übersehen. Entsprechend wurden  $p$ -Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant im Sinne der explorativen Analyse interpretiert, wobei die Ergebnisse mit Zurückhaltung bewertet werden sollten.

Vergleich man die durchschnittlichen Proliferationsraten der Einzelzellsuspensionen (Gruppen A1: MW=-17,41%  $\pm$  6,27%; A2: MW=-12,89%  $\pm$  10,75%; C: MW= -43,49%  $\pm$  6,78%) mit denen der dreidimensionalen Aggregate (Gruppen B1: MW= -69,06%  $\pm$  1,89%; B2: MW= 79,95%  $\pm$  5,65%; D1: MW= -58,44%  $\pm$  2,30%; D2: MW= -69,49%  $\pm$  14,65%; E: MW= -20,00%  $\pm$  20,00%), so fiel auf, dass die Proliferationsraten für die Gruppen A1, A2 und C in der Beobachtung höher waren als für die Gruppen B1, B2, D1 und D2. Für Gruppe E war dies nicht der Fall, da hier die durchschnittliche Proliferationsrate in der Beobachtung höher war als bei Gruppe C, jedoch immer noch kleiner als bei Gruppe A1 und A2. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte bedacht werden, dass die Wiederfindungsrate und die absolute Überlebensrate der Gruppe E sehr niedrig waren.

Bei den in Klammern angegebenen Mittelwerten handelt es sich um den Mittelwert der Proliferationsrate zum Zeitpunkt T2, wohingegen die in den Boxplots eingezeichneten Striche den Median darstellen (siehe Abbildung 17). Die Kryokonservierung jeder Gruppe wurde drei Mal ( $n=3$ ) wiederholt, sodass die Proliferationsrate jeder Gruppe drei Mal bestimmt wurde.

Zudem ließ sich feststellen, dass sich die in der Gynäkologie eingefrorenen Einzelzellsuspensionen (Gruppe C) in der Proliferationsrate mit  $p > 0,050$  nicht signifikant von den Gruppen mit dreidimensionalen Aggregaten unterschieden. Dahingegen unterschied sich die Gruppe A1 von den Gruppen B1, B2 und D2 signifikant mit  $p \leq 0,031$ . Die Gruppe A2 wies eine signifikant höhere Proliferationsrate als die Gruppen B1, B2 und D2 mit  $p \leq 0,018$  auf. Von den Gruppen D1 und E unterschieden sich die Gruppen A1 und A2 jedoch nicht signifikant mit  $p > 0,050$ .

Kein signifikanter Unterschied konnte in den paarweisen Vergleichen der Gruppe C mit den Gruppen A1 und A2 festgestellt werden. Nichtsdestotrotz wies die Gruppe C zur Gruppe A1 eine Mittelwertdifferenz von 26,08%  $\pm$  7,90% und zur Gruppe A2 eine Mittelwertdifferenz von sogar 30,59%  $\pm$  7,90% auf, wobei die Gruppe C den jeweils niedrigeren Wert stellte.

Beim Vergleich der Gruppen B1 und B2 jeweils mit den Gruppen D1 und D2 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es ließ sich jedoch beobachten, dass die Gruppe D1 eine Mittelwertdifferenz von 10,62%  $\pm$  7,90% zur Gruppe B1 und eine

Mittelwertdifferenz von  $21,51\% \pm 7,90\%$  zur Gruppe B2 aufwies. Dabei stellte die Proliferationsrate der Gruppe D1 den jeweils höheren Wert dar. Auch die Gruppe D2 zeigte eine nicht signifikant höhere Proliferationsrate im Vergleich zur Gruppe B2 mit einer Mittelwertdifferenz von  $10,46\% \pm 7,90\%$ . Ausschließlich der paarweise Vergleich zwischen Gruppe D2 und B1 zeigte, dass bei einer Mittelwertdifferenz von  $0,43\% \pm 7,90\%$  die Gruppe B1 eine sehr gering ausgeprägte, nicht signifikant höhere Proliferationsrate aufwies.

Dasselbe galt für den Vergleich zwischen den Gruppen A1 und A2. Zwar wies die Gruppe A2 eine höhere Proliferationsrate mit einer Mittelwertdifferenz von  $4,51\% \pm 7,90\%$  zur Gruppe A1 auf, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

Auch der Vergleich zwischen den Gruppen B1 und B2 ergab keinen signifikanten Unterschied, obwohl die Gruppe B1 eine höhere Proliferationsrate mit einer Mittelwertdifferenz von  $10,89\% \pm 7,90\%$  aufwies. Dasselbe galt für den Vergleich zwischen den Gruppen D1 und D2 mit einer Mittelwertdifferenz von  $11,05\% \pm 7,90\%$ , wobei die Gruppe D1 die beobachtbar höhere Proliferationsrate aufwies.

Auch konnte gezeigt werden, dass zwischen den Gruppen E und D1 eine Mittelwertdifferenz von  $38,44\% \pm 7,90\%$  bestand, die jedoch nicht signifikant war. Dabei wies die Gruppe E den höheren Wert auf.

Zu betonen ist, dass sich die Gruppe Transportkontrolle von allen Gruppen, außer den Gruppen E und Trypsinkontrolle, signifikant mit  $p \leq 0,035$  unterschied.

Zusammenfassend konnte für jede kryokonservierte Gruppe eine negative Proliferationsrate beobachtet werden. Einzelzellen wiesen eine beobachtbar höhere Proliferationsrate auf als dreidimensionale Aggregate, wobei die Gruppe E eine Ausnahme darstellte. Einzelzellen, die nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden, zeigten deskriptiv eine höhere Proliferationsrate als Einzelzellen, die nach dem gynäkologischen Protokoll eingefroren und aufgetaut wurden.

## **4.9. Durchmesser**

### **4.9.1. Durchmesserbestimmungen der Einzelzellen und dreidimensionalen Aggregate**

Der Prozess der Kryokonservierung hat nicht nur einen Effekt auf die Überlebensrate. So konnte unter anderem festgestellt werden, dass auch die Verteilung der Durchmesser von

Mikropartikeln durch die Kryokonservierung beeinflusst wird.<sup>164</sup> Inwiefern die Kryokonservierung der hiPSCs einen Einfluss auf den Durchmesser der Zellen hatte, wurde im Folgenden untersucht.

Der Durchmesser der Einzelzellen und der 3D-Aggregate wurde mit dem Cellometer® bestimmt. Wie bereits beschrieben wurde die Resuspension der Zellen in diesem Teilschritt nicht standardisiert, damit die Verteilung der Zelldurchmesser besser dargestellt werden konnte. Folglich lag der Fokus bei der Auswertung der vom Cellometer® generierten Abbildung in der Verteilung der Zellen. Ein grober Rückschluss über die relative Überlebensrate konnte aus den Abbildungen gezogen werden. Für eine standardisierte und somit exaktere Darstellung der relativen Überlebensraten sollte jedoch die Abbildung 13 hinzugezogen werden, bei der eine standardisierte Resuspension der Zellen berücksichtigt wurde (siehe 3.2.3, 3.2.4 und 4.4). Die Analyse der Histogramme in diesem Kapitel erfolgte deskriptiv.

Da für die Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1 unter den kryokonservierten Gruppen die höchsten absoluten Überlebensraten beobachtet werden konnten, wurde diese Gruppe beim Vergleich der Histogramme oftmals als Referenz genommen. Um den Einfluss der verschiedenen Protokolle auf den Durchmesser der Zellen zu beschreiben, wurden im Folgenden zur besseren Übersichtlichkeit die Gruppen A1, Trypsinkontrolle, B1 und D1 mit der Gruppe A2 verglichen.

#### **4.9.1.1 Durchmesserbestimmungen der Gruppen A2 und A1**

Zunächst soll der Effekt der Kryokonservierung auf den Durchmesser der hiPSCs beschrieben werden.

Abbildung 18 zeigt die verschiedenen Histogramme der Gruppe A2 und A1:

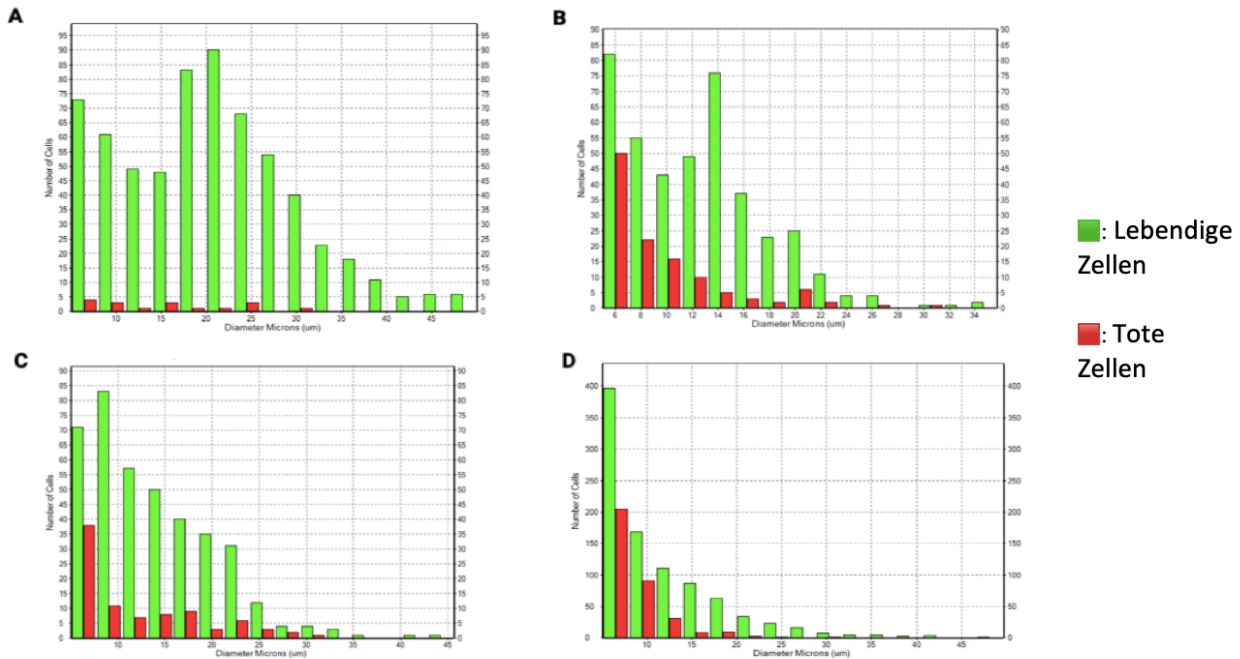


Abbildung 18: Histogramme der Zelldurchmesser der Gruppen A1 und A2

(A) Histogramm der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0

(B) Histogramm der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1

(C) Histogramm der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T2

(D) Histogramm der Gruppe A1 zum Zeitpunkt T1

#### 4.9.1.1.1 Durchmesserbestimmungen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0

(A) Exemplarisch wurde, um den Durchmesser vor der Kryokonservierung zu betrachten, die Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 betrachtet. Der Durchmesser von N=652 Zellen wurde hierbei bestimmt. Dabei wurden n=635 Zellen als lebendig und n=17 Zellen als tot gewertet. Der durchschnittliche Durchmesser aller Zellen betrug  $20,12\mu\text{m} \pm 9,53\mu\text{m}$ . Das Maximum lag bei  $49,97\mu\text{m}$  und stellt den Wert einer lebendigen Zelle dar. Das Minimum lag bei  $5,04\mu\text{m}$  und wurde jeweils mehreren lebendigen Zellen zugeschrieben.

Ferner wurde der Durchmesser der lebendigen Zellen vom Durchmesser der toten Zellen unterschieden. Lebendige Zellen wiesen dabei einen Durchmesser von durchschnittlich  $20,25\mu\text{m} \pm 9,54\mu\text{m}$  auf. Tote Zellen hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von  $15,18\mu\text{m} \pm 8,02\mu\text{m}$ . Die Mittelwertdifferenz betrug folglich  $5,07\mu\text{m}$ . Grob gesehen lag bei der Betrachtung der Durchmesser der lebendigen Zellen eine leichte Abweichung der Normalverteilung vor. Das 95% Konfidenzintervall der toten Zellen lag zwischen  $10,65\mu\text{m}$  und  $19,70\mu\text{m}$ , das für die lebendigen Zellen zwischen  $19,51\mu\text{m}$  und  $20,99\mu\text{m}$ .

Bei Betrachtung des Histogramms ließ sich die Beobachtung aufstellen, dass lebendige Zellen einen durchschnittlich höheren Durchmesser als tote Zellen aufwiesen. Insgesamt war der Anteil an toten Zellen als gering zu werten ( $n=17$ ).

Da sich die Basis Überlebensraten, mit Ausnahme der Gruppe S, kaum voneinander unterschieden (siehe 4.1), wurde hier zur besseren Übersichtlichkeit die Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 als Referenz genommen, die einen Zustand vor der Kryokonservierung abbilden sollte.

#### **4.9.1.1.2 Durchmesserbestimmungen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1**

(B) Um aufzuzeigen, dass sich unmittelbar nach der Kryokonservierung eine Veränderung der Durchmesser-Verteilung beobachten ließ, wurde hier exemplarisch für die Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1 der Durchmesser von  $N=531$  Zellen bestimmt. Davon wurden  $n=413$  Zellen als lebendig und  $n=118$  Zellen als tot gewertet. Demnach konnte im Vergleich zu T0 ein höherer relativer Anteil an toten Zellen verzeichnet werden. Dies spiegelt sich bei Betrachtung der relativen Überlebensrate wider, welche bei der Gruppe A2 niedriger als die Basis Überlebensrate war (siehe 4.1 und 4.4).

Der durchschnittliche Durchmesser aller Zellen betrug  $11,85\mu\text{m} \pm 5,46\mu\text{m}$ . Die lebendigen Zellen wiesen einen durchschnittlichen Durchmesser von  $12,47\mu\text{m} \pm 5,44\mu\text{m}$  auf, die toten einen mittleren Durchmesser von  $9,64\mu\text{m} \pm 4,95\mu\text{m}$ . Die Mittelwertdifferenz lag folglich bei  $2,83\mu\text{m}$ . Das Minimum lag bei  $5,04\mu\text{m}$  und bezog sich auf den Durchmesser je einer toten und einer lebendigen Zelle. Der maximale Wert wurde von einer lebendigen Zelle mit  $35,68\mu\text{m}$  erreicht. Das 95% Konfidenzintervall der toten Zellen lag zwischen  $8,68\mu\text{m}$  und  $10,61\mu\text{m}$ , wohingegen jenes der lebendigen Zellen sich zwischen  $11,96\mu\text{m}$  und  $12,99\mu\text{m}$  befand.

Beim Vergleich der beiden Histogramme der Gruppe A2 zwischen T0 und T1 konnte nicht nur ein höherer relativer Anteil der toten Zellen beobachtet werden. Auch eine Linksverschiebung der mittleren Durchmesser der lebendigen Zellen konnte bei Betrachtung der Histogramme visualisiert werden, welche auch in den deskriptiven Daten erkennbar war. So betrug die Mittelwertdifferenz der Durchmesser der lebendigen Zellen zwischen T0 und T1  $7,78\mu\text{m}$ . Demnach konnte beobachtet werden, dass die lebendigen Zellen direkt nach der Kryokonservierung schrumpften. Auch die toten Zellen schienen nach der Kryokonservierung kleiner zu sein. Die Mittelwertdifferenz zwischen T0 und T1 betrug hier  $5,54\mu\text{m}$ . Eine Schrumpfung spiegelte sich ebenso in der Mittelwertdifferenz aller Zellen zum Zeitpunkt T0 und T1 wider. Diese betrug  $8,27\mu\text{m}$ . Folglich konnte eine durchschnittliche Abnahme des Durchmessers sowohl bei lebendigen als auch bei toten Zellen unmittelbar nach der Kryokonservierung beobachtet werden.



#### **4.9.1.1.3 Durchmesserbestimmungen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T2**

(C) 24h nach dem Auftauen wurde erneut der Durchmesser bestimmt. Exemplarisch wurde hier zur besseren Vergleichbarkeit die Gruppe A2 gewählt, sodass der langfristige Effekt der Kryokonservierung auf den Durchmesser bestimmt werden konnte. Es wurde der Durchmesser von N=481 Zellen bestimmt. Davon waren n=393 Zellen lebendig und n=88 tot. Der durchschnittliche Durchmesser aller Zellen zum Zeitpunkt T2 betrug für diese Gruppe  $13,48\mu\text{m} \pm 6,77\mu\text{m}$ . Lebendige Zellen hatten einen Durchmesser von  $13,84\mu\text{m} \pm 6,70\mu\text{m}$ . Für tote Zellen lag der mittlere Durchmesser bei  $11,85\mu\text{m} \pm 6,85\mu\text{m}$ . Die Mittelwertdifferenz betrug somit  $1,99\mu\text{m}$ . Das Minimum lag bei  $5,04\mu\text{m}$  und bildete den Wert jeweils zweier lebendiger Zellen sowie einer toten Zelle ab. Der maximale Wert lag bei  $45,61\mu\text{m}$  und bezog sich auf eine lebendige Zelle. Das 95% Konfidenzintervall der toten Zellen lag zwischen  $10,44\mu\text{m}$  und  $13,26\mu\text{m}$ . Das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen befand sich im Bereich zwischen  $13,18\mu\text{m}$  und  $14,51\mu\text{m}$ .

Verglich man das Histogramm der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T2 mit jenem zum Zeitpunkt T0, dann fiel auf, dass der relative Anteil an toten Zellen 24h nach der Kryokonservierung höher war. Dies konnte beim Vergleich der Basis Überlebensrate mit der relativen Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 ebenso beobachtet werden. Die Linksverschiebung der lebendigen Zellen fiel auch im Vergleich der Histogramme T0 und T2 auf. Die Mittelwertdifferenz der Durchmesser der lebendigen Zellen zwischen T0 und T2 betrug  $6,41\mu\text{m}$ . Für tote Zellen betrug die Mittelwertdifferenz zwischen T0 und T2  $3,33\mu\text{m}$ . Für alle Zellen betrug die Mittelwertdifferenz zwischen T0 und T2  $6,64\mu\text{m}$ . Folglich konnte im Vergleich zu T0 sowohl für lebendige als auch tote Zellen eine Abnahme der Durchmesser zum Zeitpunkt T2 verzeichnet werden.

Wurde der Vergleich der Gruppe A2 zwischen den Zeitpunkten T1 und T2 gezogen, so schien bei Betrachtung der Histogramme der relative Anteil an toten Zellen zum Zeitpunkt T1 höher als zu T2. Ein Anstieg der relativen Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 konnte auch nach standardisierter Berechnung für die Gruppe A2 beobachtet werden (siehe 4.4). Die Mittelwertdifferenz der Durchmesser der lebendigen Zellen zwischen T1 und T2 betrug  $1,37\mu\text{m}$ . Die Mittelwertdifferenz der toten Zellen zwischen T1 und T2 betrug  $2,21\mu\text{m}$ . Für alle Zellen lag die Mittelwertdifferenz zwischen T1 und T2 bei  $1,63\mu\text{m}$ . Folglich konnte ein Wachstum sowohl der lebendigen als auch toten Zellen 24h nach dem Auftauen beobachtet werden, wobei eine Rechtsverschiebung in den Histogrammen kaum zu erkennen war.

#### **4.9.1.1.4 Durchmesserbestimmungen der Gruppe A1 zum Zeitpunkt T1**

(D) Damit der Durchmesser beider Einfriermedien verglichen werden kann, wurde das Histogramm der Gruppe A1 für N=1267 Zellen zum Zeitpunkt T1 bestimmt. Davon waren n=919 Zellen lebendig und n=348 Zellen tot.

Der durchschnittliche Durchmesser aller Zellen betrug  $10,49\mu\text{m} \pm 6,03\mu\text{m}$ . Das Minimum lag bei  $5,04\mu\text{m}$  und wurde sowohl toten als auch lebendigen Zellen zugeschrieben. Das Maximum wies eine lebendige Zelle mit einem Wert von  $49,66\mu\text{m}$  auf. Der durchschnittliche Durchmesser der lebendigen Zellen lag bei  $11,32\mu\text{m} \pm 6,59\mu\text{m}$ . Der mittlere Durchmesser der toten Zellen entsprach  $8,30\mu\text{m} \pm 3,36\mu\text{m}$ . Die Mittelwertdifferenz zwischen lebendigen und toten Zellen lag bei  $3,02\mu\text{m}$ . Das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen befand sich zwischen  $10,94\mu\text{m}$  und  $11,70\mu\text{m}$ . Das 95% Konfidenzintervall der toten Zellen lag zwischen  $7,68\mu\text{m}$  und  $8,92\mu\text{m}$ .

Durch den Vergleich mit Histogramm der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 sollte der unmittelbare Effekt der Kryokonservierung aufgezeigt werden. Demnach bestand die Annahme, dass die Zellen der Gruppe A1 zum Zeitpunkt T0 ein ähnliches Histogramm aufwiesen wie die Gruppe A2 zum gleichen Zeitpunkt. Die Mittelwertdifferenz der Durchmesser aller Zellen betrug  $9,63\mu\text{m}$ . Die Mittelwertdifferenz der Durchmesser der lebendigen Zellen lag bei  $8,93\mu\text{m}$  und der toten Zellen bei  $6,88\mu\text{m}$ . Folglich war davon auszugehen, dass sowohl lebendige als auch tote Zellen der Gruppe A1 unmittelbar nach dem Einfrieren einen niedrigeren Durchmesser aufwiesen. Dies spiegelte sich in einer Linksverschiebung der Histogramme, insbesondere der lebendigen Zellen, sowie in einer erniedrigten relativen Überlebensrate der Zellen zum Zeitpunkt T1 wider.

Damit die beiden Einfriermedien verglichen werden konnten, wurden die Mittelwertdifferenzen zum Zeitpunkt T1 der Gruppen A1 und A2 gebildet. Diese betrug für alle Zellen (sowohl tot als auch lebendig)  $1,36\mu\text{m}$ . Für lebendige Zellen lag die Mittelwertdifferenz zwischen den beiden Gruppen bei  $1,15\mu\text{m}$  und für tote Zellen bei  $1,34\mu\text{m}$ . Folglich ließ sich rein deskriptiv feststellen, dass die Zellen der Gruppe A2 unmittelbar nach der Kryokonservierung einen höheren Durchmesser aufwiesen als die Zellen der Gruppe A1. Betrachtete man die Histogramme, so ließ sich ebenso eine Linksverschiebung des Histogramms D im Vergleich zum Histogramm B feststellen. Aufgrund der Skalierung der Ordinate hätte bei der optischen Betrachtung angenommen werden können, dass die Gruppe A2 einen höheren relativen Anteil an toten Zellen hatte. Dies konnte nach der Berechnung des Cellometers® nicht bestätigt werden, da der relative Anteil der toten Zellen bei der Gruppe A1 höher war. Beim Hinzuziehen der relativen Überlebensraten konnte ebenso die Tendenz beobachtet werden, dass die relative Überlebensrate zum Zeitpunkt T1 für die Gruppe A2 höher war als für die Gruppe A1 (siehe 4.4).

Auf eine Betrachtung des Histogramms der Gruppe A1 zum Zeitpunkt T2 wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

#### 4.9.1.2 Durchmesserbestimmungen der Gruppe Trypsinkontrolle

Auch der Effekt der Inkubation mit Trypsin auf den Durchmesser wurde näher betrachtet. Die Analyse mit dem Cellometer® ergab für die Trypsinkontrollgruppe folgende, exemplarisch ausgewählte Histogramme, welche in Abbildung 19 dargestellt werden:

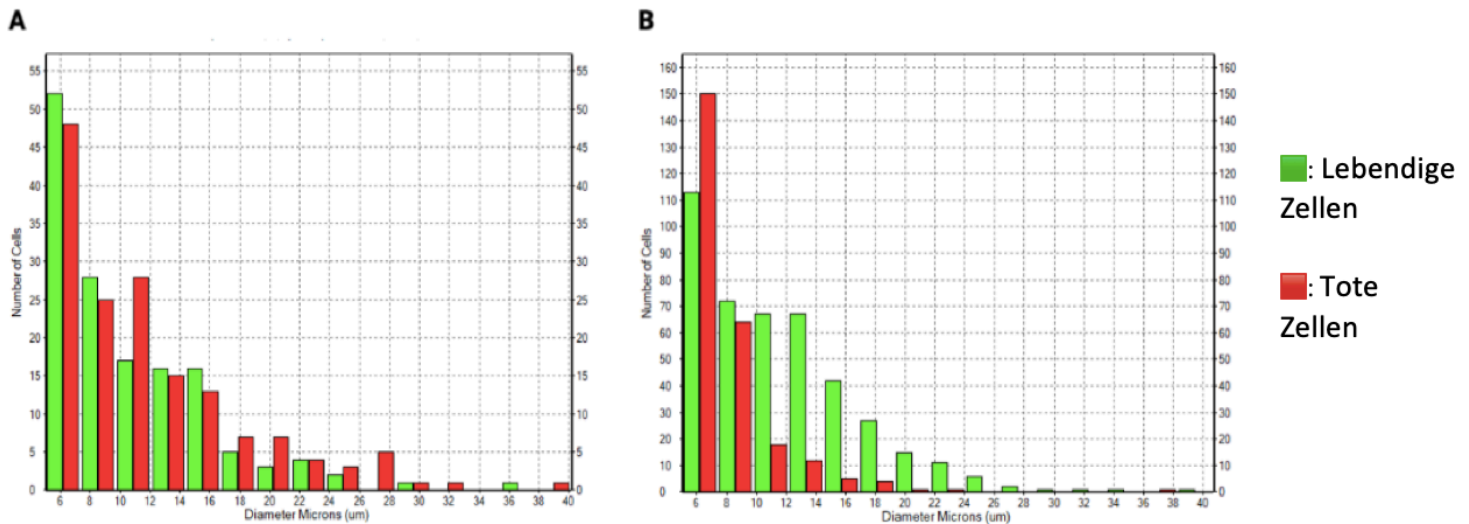


Abbildung 19: Histogramme der Zelldurchmesser der Gruppe Trypsinkontrolle

(A) Histogramm der Gruppe Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T1

(B) Histogramm der Gruppe Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T2

##### 4.9.1.2.1 Durchmesserbestimmungen der Gruppe Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T1

(A) Um den Effekt der Inkubation mit Trypsin auf den Zelldurchmesser zu quantifizieren, wurde der Durchmesser von N=303 Zellen bestimmt, wovon n= 145 Zellen als lebendig und n=158 Zellen als tot gewertet wurden.

Der minimale Durchmesser betrug 5,04µm und wurde je zwei toten Zellen und einer lebendigen Zelle zugeschrieben. Den maximalen Durchmesser wies eine tote Zelle mit 40,13µm auf. Der mittlere Durchmesser aller Zellen nach Trypsinierung betrug 11,29µm ± 6,09µm. Der durchschnittliche Durchmesser der lebendigen Zellen lag bei 10,73µm ± 5,55µm, wohingegen der mittlere Durchmesser der toten Zellen 11,80µm ± 6,53µm betrug. Die Mittelwertdifferenz zwischen den lebendigen und toten Zellen lag bei 1,07µm. Das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen war im Bereich von 9,74µm bis 11,73µm. Das 95% Konfidenzintervall der toten Zellen lag zwischen 10,85µm und 12,76µm.

Verglich man die Werte der Durchmesser nach der Trypsinierung zu T1 mit den Werten der nicht-kryokonservierten Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0, so betrug die Mittelwertdifferenz aller Zellen 8,83µm. Bei den lebendigen Zellen hatte die Mittelwertdifferenz einen Wert von 9,52µm, wohingegen der Wert für tote Zellen bei 3,38µm lag. Beim optischen Vergleich der Histogramme fiel auf, dass eine Linksverschiebung der lebendigen Zellen nach der Inkubation mit Trypsin auftrat. Des Weiteren nahm der relative Anteil an toten Zellen mit der Zeit zu. Dies konnte beim Heranziehen der Überlebensraten ebenso beobachtet werden.

#### **4.9.1.2.2 Durchmesserbestimmungen der Gruppe Trypsinkontrolle zum Zeitpunkt T2**

(B) 24h nach der Inkubation mit Trypsin wurde erneut der Durchmesser bestimmt. Von insgesamt N=682 gemessenen Zellen waren n= 426 lebendig und n=256 Zellen tot. Das Minimum lag bei 5,04µm und wurde jeweils mehreren toten als auch lebendigen Zellen zugeschrieben. Das Maximum wies eine lebendige Zelle mit 40,67µm auf.

Der durchschnittliche Durchmesser aller Zellen 24h nach Trypsinisierung betrug  $10,28\mu\text{m} \pm 5,16\mu\text{m}$ . Der durchschnittliche Durchmesser der lebendigen Zellen lag bei  $11,72\mu\text{m} \pm 5,44\mu\text{m}$ , wohingegen der mittlere Durchmesser der toten Zellen einen Wert von  $7,89\mu\text{m} \pm 3,55\mu\text{m}$  annahm. Dies entsprach einer Mittelwertdifferenz von 3,83µm. Das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen lag zwischen 11,26µm und 12,18µm. Das der toten Zellen befand sich im Bereich zwischen 7,29µm und 8,48µm.

Der Vergleich der Werte unmittelbar nach der Trypsinierung (T1) mit den Werten 24h nach der Kultur (T2) zeigte, dass die lebendigen Zellen zwischen den beiden Zeitpunkten eine Mittelwertdifferenz von 0,99µm und die toten Zellen eine von 3,91µm aufwiesen. Folglich ließ sich ein Wachstum des Durchmessers der lebendigen Zellen 24h nach der Trypsinierung beobachten. Dahingegen wurde ein schrumpfender Durchmesser der toten Zellen beobachtet. Insgesamt betrachtet war der Durchmesser aller Zellen bei einer Mittelwertdifferenz von 1,01µm zum Zeitpunkt T2 kleiner. Bei Betrachtung des Histogramms ließ sich das Wachstum der lebendigen Zellen durch die Rechtsverschiebung und das Schrumpfen der toten Zellen durch die Linksverschiebung feststellen. Auch konnte die Tendenz erkannt werden, dass der relative Anteil an toten Zellen zum Zeitpunkt T2 abnahm. Dies konnte bei Betrachtung der relativen Überlebensraten ebenso bestätigt werden (siehe 4.4).

#### **4.9.1.3 Durchmesserbestimmungen der Gruppe B1 und D1**

Damit der Effekt der Kryokonservierung nach dem etablierten Protokoll auf 3D-Aggregate gezeigt werden konnte, wurde exemplarisch die Gruppe B1 gewählt. Um einen Vergleich zu dem gynäkologischen Protokoll ziehen zu können, wurde exemplarisch die Gruppe D1

ausgesucht. Die Histogramme der Gruppe B1 und D1 können durch Abbildung 20 veranschaulicht werden:

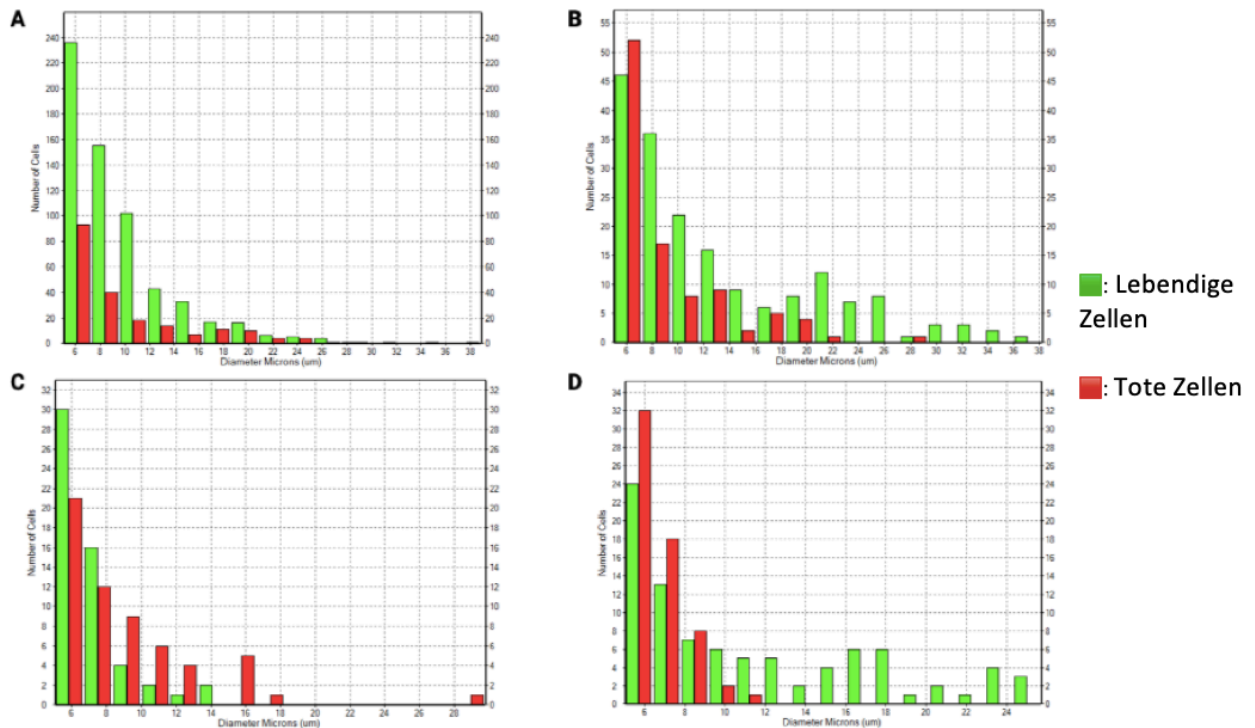


Abbildung 20: Histogramme der Zelldurchmesser der Gruppen B1 und D1

(A) Histogramm der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T1

(B) Histogramm der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T2

(C) Histogramm der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T1

(D) Histogramm der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T2

#### 4.9.1.3.1 Durchmesserbestimmungen der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T1

(A) Es wurde zum Zeitpunkt T1 der Durchmesser von N=824 Zellen bestimmt. Davon waren n= 619 lebendig und n= 205 tot. Der minimale Durchmesser lag bei 5,04µm und wurde sowohl bei lebendigen als auch bei toten Zellen gemessen. Den maximalen Durchmesser von 38,82µm wies eine tote Zelle auf. Der mittlere Durchmesser aller Zellen betrug  $9,61\mu\text{m} \pm 4,73\mu\text{m}$ . Bei den lebendigen Zellen lag der durchschnittliche Durchmesser bei  $9,46\mu\text{m} \pm 4,34\mu\text{m}$ . Tote Zellen wiesen einen mittleren Durchmesser von  $10,09\mu\text{m} \pm 5,74\mu\text{m}$  auf. Folglich betrug die Mittelwertdifferenz zwischen lebendigen und toten Zellen 0,63µm. Das 95% Konfidenzintervall für lebendige Zellen lag im Bereich 9,09µm bis 9,83µm, jenes für tote Zellen zwischen 9,44µm und 10,74µm.

Zunächst konnten die Durchmesser dieser Gruppe mit jenen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 verglichen werden. Auch hier wurde die Annahme getroffen, dass die Zellen der Gruppe B1

vor der Kryokonservierung eine ähnliche Verteilung der Durchmesser aufwiesen wie die Gruppe A2. Die Mittelwertdifferenz betrug für alle Zellen  $10,51\mu\text{m}$ , für lebendige Zellen  $10,79\mu\text{m}$  und für tote Zellen  $5,09\mu\text{m}$ . Demnach zeigte sich eine Schrumpfung lebendiger und toter Zellen der Gruppe B1. Beim optischen Vergleich beider Histogramme fiel der erhöhte relative Anteil toter Zellen auf. Dies ließ sich ebenso bei Betrachtung der Überlebensraten beobachten. Überdies wies das Histogramm der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zum Histogramm der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 eine Linksverschiebung der lebendigen Zellen auf. Des Weiteren nahm die Streubreite der Durchmesser der lebendigen Zellen mit der Zeit ab.

Wurde der Vergleich der Durchmesser der Gruppe B1 mit der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1 gezogen, so wurden Einzelzellen mit 3D-Aggregaten unmittelbar nach der Kryokonservierung verglichen. Die Mittelwertdifferenz aller Zellen betrug  $2,24\mu\text{m}$ . Für lebendige Zellen lag die Mittelwertdifferenz bei  $3,01\mu\text{m}$  und für tote Zellen bei  $0,45\mu\text{m}$ . Folglich ließ sich beobachten, dass lebendige Zellen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1 größer waren als lebendige Zellen der Gruppe B1. Dahingegen war deskriptiv festzustellen, dass tote Zellen der Gruppe B1 größer waren als tote Zellen der Gruppe A2. Bei der Betrachtung der Histogramme ließ sich optisch kein erhöhter relativer Anteil toter Zellen zwischen beiden Gruppen erkennen, wobei rechnerisch dieser Anteil für die Gruppe B1 höher war. Durch Heranziehen der relativen Überlebensrate konnte deskriptiv jedoch gesehen werden, dass die relative Überlebensrate zu T1 für die Gruppe B1 höher war als für die Gruppe A2 (siehe 4.4). Eine Linksverschiebung der Durchmesser der lebendigen Zellen ließ sich feststellen. Auffällig war jedoch, dass die Streubreite der Durchmesser bei Gruppe B1 kleiner zu sein schien als bei der Gruppe A2. Des Weiteren nahm die Häufigkeitsverteilung der Durchmesser der Gruppe B1, insbesondere der lebendigen Zellen, graduell ab. Die größte Säule der lebendigen Zellen wurde im Bereich unter  $6\mu\text{m}$  erreicht. Je größer der gemessene Durchmesser, desto kleiner der Anteil jener Zellen, die einen solchen Durchmesser aufwiesen.

#### **4.9.1.3.2 Durchmesserbestimmungen der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T2**

(B) Bei der Gruppe B2 wurde zum Zeitpunkt T2 der Durchmesser von  $N=279$  Zellen bestimmt. Davon waren  $n=180$  Zellen lebendig und  $n=99$  Zellen tot. Der minimale Durchmesser lag bei  $5,04\mu\text{m}$  und wurde von mehreren Zellen erreicht. Der maximale Durchmesser mit  $38,19\mu\text{m}$  wurde von einer lebendigen Zelle erreicht. Der durchschnittliche Durchmesser aller Zellen lag bei  $11,66\mu\text{m} \pm 7,00\mu\text{m}$ . Lebendige Zellen wiesen einen durchschnittlichen Durchmesser von  $13,13\mu\text{m} \pm 7,66\mu\text{m}$  und tote Zellen einen von  $8,99\mu\text{m} \pm 4,54\mu\text{m}$  auf. Demnach lag die Mittelwertdifferenz zwischen lebendigen und toten Zellen bei  $4,14\mu\text{m}$ . Im Bereich zwischen

12,14µm und 14,11µm befand sich das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen, wohingegen dieses für tote Zellen zwischen 7,66µm und 10,32µm lag.

Wurde der Zeitpunkt T1 mit dem Zeitpunkt T2 der Gruppe B1 verglichen, so fiel auf, dass alle Zellen (sowohl lebendig als auch tot) eine Mittelwertdifferenz von 2,05µm aufwiesen. Die Mittelwertdifferenz für lebendige Zellen betrug 3,67µm und für tote Zellen 1,1µm. Demnach ließ sich beobachten, dass lebendige Zellen 24h nach dem Auftauen einen durchschnittlich höheren Durchmesser aufwiesen, wohingegen tote Zellen zu schrumpfen schienen. Wurden die Histogramme verglichen, so fiel der höhere relative Anteil toter Zellen zum Zeitpunkt T2 auf. Bei Betrachtung der relativen Überlebensraten konnte dies ebenso beobachtet werden (siehe 4.4). Des Weiteren zeigte sich die Vergrößerung lebendiger Zellen anhand einer Rechtsverschiebung sowie einer höheren Streubreite, was sich im 95% Konfidenzintervall widerspiegelte. Eine Linksverschiebung der toten Zellen zum Zeitpunkt T2 ließ sich aufgrund der geringen Mittelwertdifferenz nicht erkennen.

In der Gruppe A2 zeigte sich zum Zeitpunkt T2 eine Mittelwertdifferenz von 1,82µm über alle Zellen, von 0,71µm bei den lebendigen Zellen und von 2,68µm bei den toten Zellen, wenn der Vergleich zur Gruppe B1 zum Zeitpunkt T2 gezogen wurde. Folglich wiesen sowohl lebendige als auch tote Zellen der Gruppe A2 24h nach dem Auftauen rein deskriptiv höhere Durchmesser auf als jene Zellen der Gruppe B1. Bei Betrachtung der Histogramme fiel auf, dass der relative Anteil toter Zellen der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T2 höher war als bei der Gruppe A2. Bei der Betrachtung der relativen Überlebensraten konnte dies ebenso bestätigt werden (siehe 4.4). Eine Linksverschiebung des Histogramms der Gruppe B2 konnte optisch nicht eindeutig erkannt werden.

#### **4.9.1.3.3 Durchmesserbestimmungen der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T1**

(C) Damit der Vergleich zum gynäkologischen Protokoll gezogen werden konnte, wurde exemplarisch die Gruppe D1 zum Zeitpunkt T1 analysiert. Dazu wurden N=114 Zellen analysiert. Davon waren n=55 lebendig und n=59 Zellen tot. Der minimale Durchmesser betrug 5,04µm und wurde je einer toten und einer lebendigen Zelle zugeschrieben. Mit 29,77µm erreichte eine tote Zelle den maximal gemessenen Durchmesser. Der Mittelwert der Durchmesser aller Zellen betrug  $8,12\mu\text{m} \pm 3,56\mu\text{m}$ . Die lebendigen Zellen wiesen einen durchschnittlichen Durchmesser von  $7,15\mu\text{m} \pm 2,21\mu\text{m}$  auf, wohingegen tote Zellen einen mittleren Durchmesser von  $9,03\mu\text{m} \pm 4,29\mu\text{m}$  hatten. Demnach betrug die Mittelwertdifferenz zwischen lebendigen und toten Zellen 1,88µm. Folglich wiesen rein deskriptiv tote Zellen einen höheren Durchmesser auf. Das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen war im Bereich von 6,23µm bis 8,07µm, jenes der toten Zellen lag zwischen 8,15µm und 9,92µm.

Wurde der Vergleich zur Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 gezogen, so betrug die Mittelwertdifferenz für alle Zellen  $12\mu\text{m}$ , für lebendige Zellen  $13,1\mu\text{m}$  und für tote Zellen  $6,15\mu\text{m}$ . Folglich waren sowohl lebendige als auch tote Zellen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 größer. Erneut wurde die Annahme getroffen, dass die Zellen der Gruppe D1 vor der Kryokonservierung eine ähnliche Verteilung der Durchmesser aufwiesen wie die Gruppe A2. Wurden die Histogramme der Gruppe D1 zu T1 mit der Gruppe A2 zu T0 optisch miteinander verglichen, so fiel bei der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T1 eine Linksverschiebung der lebendigen Zellen auf. Dies konnte auch bei Betrachtung der Überlebensraten bestätigt werden. Eine Linksverschiebung der toten Zellen konnte aufgrund des geringen relativen Anteils der toten Zellen der Gruppe A2 zu T0 nicht beobachtet werden. Des Weiteren fiel eine Erhöhung des relativen Anteils der toten Zellen auf, was ebenso nach genauer Betrachtung der Überlebensraten bestätigt werden konnte.

Verglich man die Werte der Gruppe D1 mit jenen der Gruppe A2 zum Zeitpunkt T1, so stellte man fest, dass die Mittelwertdifferenz für alle Zellen  $3,73\mu\text{m}$ , für lebendige Zellen  $5,32\mu\text{m}$  und für tote Zellen  $0,61\mu\text{m}$  betrug. Demnach ließ sich beobachten, dass die Zellen der Gruppe A2 unmittelbar nach der Kryokonservierung größer waren als die Zellen der Gruppe D1. Bei Betrachtung der Histogramme fiel eine deutliche Linksverschiebung der lebendigen Zellen der Gruppe D1 auf. Da die Mittelwertdifferenz für tote Zellen gering war, konnte hier keine Verschiebung festgestellt werden. Ein erhöhter relativer Anteil toter Zellen bei der Gruppe D1 fiel in den Histogrammen auf. Bei Betrachtung der relativen Überlebensraten konnte jedoch beobachtet werden, dass der beobachtete Unterschied der relativen Überlebensrate zu der Gruppe A2 zu T1 nicht derart groß war (siehe 4.4).

Um den Vergleich zum bereits etablierten Protokoll ziehen zu können, wurden die Werte der Durchmesser der Gruppe D1 mit jenen der Gruppe B1 zu T1 verglichen. So wurden Mittelwertdifferenzen von  $1,49\mu\text{m}$  für alle Zellen,  $2,31\mu\text{m}$  für lebendige Zellen und  $1,06\mu\text{m}$  für tote Zellen festgestellt. Demnach wiesen deskriptiv betrachtet unmittelbar nach der Kryokonservierung die Zellen der Gruppe B1 einen höheren Durchmesser auf als Zellen der Gruppe D1. Beim Vergleich der Histogramme fiel ein erhöhter relativer Anteil toter Zellen in der Gruppe D1 auf. Eine erniedrigte relative Überlebensrate der Gruppe D1 konnte auch bei Betrachtung der relativen Überlebensrate beobachtet werden (siehe 4.4). Ebenso konnte eine diskrete Linksverschiebung der lebendigen Zellen in der Gruppe D1 festgestellt werden. Dies konnte für tote Zellen visuell nicht beobachtet werden.



#### **4.9.1.3.4 Durchmesserbestimmungen der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T2**

(D) Um den Vergleich zum gynäkologischen Protokoll auch 24h nach dem Auftauen ziehen zu können, wurde ebenso der Durchmesser der Zellen der Gruppe D2 zum Zeitpunkt T2 bestimmt. Dabei wurden N=150 Zellen analysiert. Davon waren n=89 lebendig und n=61 tot. Das Minimum lag bei  $5,04\mu\text{m}$  und wurde drei toten Zellen zugeschrieben. Das Maximum lag bei  $25,71\mu\text{m}$  und wurde von einer lebendigen Zelle erreicht. Der mittlere Durchmesser aller Zellen lag bei  $9,42\mu\text{m} \pm 5,22\mu\text{m}$ . Der durchschnittliche Durchmesser der lebendigen Zellen war bei  $11,30\mu\text{m} \pm 6,02\mu\text{m}$ . Dahingegen erreichte der mittlere Durchmesser der toten Zellen  $6,68\mu\text{m} \pm 1,29\mu\text{m}$ . Demnach lag die Mittelwertdifferenz bei  $4,62\mu\text{m}$ . Das 95% Konfidenzintervall der lebendigen Zellen befand sich im Bereich zwischen  $10,32\mu\text{m}$  und  $12,29\mu\text{m}$ , wohingegen jenes der toten Zellen zwischen  $5,49\mu\text{m}$  und  $7,88\mu\text{m}$  lag.

Wurden diese Werte mit den Werten zum Zeitpunkt T1 der Gruppe D1 verglichen, so beobachtete man, dass die lebendigen Zellen 24h nach dem Auftauen einen höheren Durchmesser aufwiesen, wohingegen tote Zellen zu schrumpfen schienen. Dies konnte durch die Mittelwertdifferenzen beobachtet werden. So betrug diese für alle Zellen  $1,3\mu\text{m}$ , für lebendige Zellen  $4,15\mu\text{m}$  und für tote Zellen  $2,35\mu\text{m}$ . Bei Betrachtung der Histogramme fiel ebenso eine Rechtsverschiebung der lebendigen Zellen zum Zeitpunkt T2 auf, welche sich in der Verschiebung des 95% Konfidenzintervalls der lebendigen Zellen in Richtung höhere Bereiche widerspiegelte. Eine diskrete Linksverschiebung der toten Zellen konnte ebenso festgestellt werden. Eine Erhöhung des Anteils der toten Zellen ließ sich optisch nicht feststellen. Rechnerisch ermittelte das Cellometer® jedoch einen erhöhten Anteil toter Zellen zum Zeitpunkt T1. Bei Betrachtung der relativen Überlebensraten konnte jedoch beobachtet werden, dass diese für den Zeitpunkt T1 höher war als zum Zeitpunkt T2 (siehe 4.4), auch wenn bei der Auswertung des Cellometers relativ betrachtet mehr tote Zellen zum Zeitpunkt T1 gezählt wurden.

Wurde der Vergleich der Gruppe D1 zur Gruppe A2 zum Zeitpunkt T2 gezogen, so betrugen die Mittelwertdifferenzen für alle Zellen  $4,06\mu\text{m}$ , für lebendige Zellen  $2,54\mu\text{m}$  und für tote Zellen  $5,17\mu\text{m}$ . Demnach waren lebendige und tote Zellen rein deskriptiv betrachtet in der Gruppe A2 größer als jene aus der Gruppe D1. Dies spiegelte sich auch in einer Verschiebung der 95% Konfidenzintervalle der lebendigen und toten Zellen der Gruppe A2 zu höheren Bereichen wider. Bei Betrachtung der Histogramme fiel auf, dass die Streubreite der toten Zellen in der Gruppe A2 größer zu sein schien. In den Histogrammen schien der relative Anteil toter Zellen in der Gruppe D1 zu T2 höher zu sein als in der Gruppe A2. Diese Tendenz konnte beim Heranziehen der relativen Überlebensraten ebenso beobachtet werden (siehe 4.4).

Vergleich man die Werte der Gruppe D1 zum Zeitpunkt T2 mit jenen der Gruppe B1 zum Zeitpunkt T2, so betrugen die Mittelwertdifferenzen für alle Zellen  $2,24\mu\text{m}$ , für lebendige Zellen  $1,83\mu\text{m}$  und für tote Zellen  $2,31\mu\text{m}$ . Folglich wiesen rein deskriptiv die Zellen der Gruppe B1 24h nach dem Auftauen einen höheren Durchmesser auf als Zellen der Gruppe D1. Bei Betrachtung der Histogramme fiel auf, dass bei den lebendigen Zellen beider Gruppen eine heterogene Verteilung der Durchmesser beobachtet wurde, sodass man von einem ungleichmäßigen Wachstum der Kolonien ausgehen konnte. Optisch konnte für lebendige Zellen keine Verschiebung beobachtet werden. Für tote Zellen konnte die Linksverschiebung in der Gruppe D1 aufgrund der höheren Mittelwertdifferenz und der geringeren Streubreite jedoch besser erkannt werden. Laut der Analyse des Cellometers® war der Anteil toter Zellen für die Gruppe D1 leicht höher als für die Gruppe B1. Dies konnte bei Betrachtung der relativen Überlebensraten ebenso beobachtet werden (siehe 4.4).

#### **4.9.2. Durchmesserbestimmung der Sphäroide**

##### **4.9.2.1 Überprüfung der Voraussetzungen**

Zur Berechnung einer ANOVA mussten zunächst die Voraussetzungen Normalverteilung der Residuen, Sphärizität und das Fehlen von Ausreißern überprüft werden. Um eine Normalverteilung der Residuen zu überprüfen, wurde ein Q-Q-Diagramm erstellt und visuell analysiert, ob die Punkte auf der Geraden liegen. Dies wurde exemplarisch für den Zeitpunkt T2 in Abbildung 21 dargestellt:

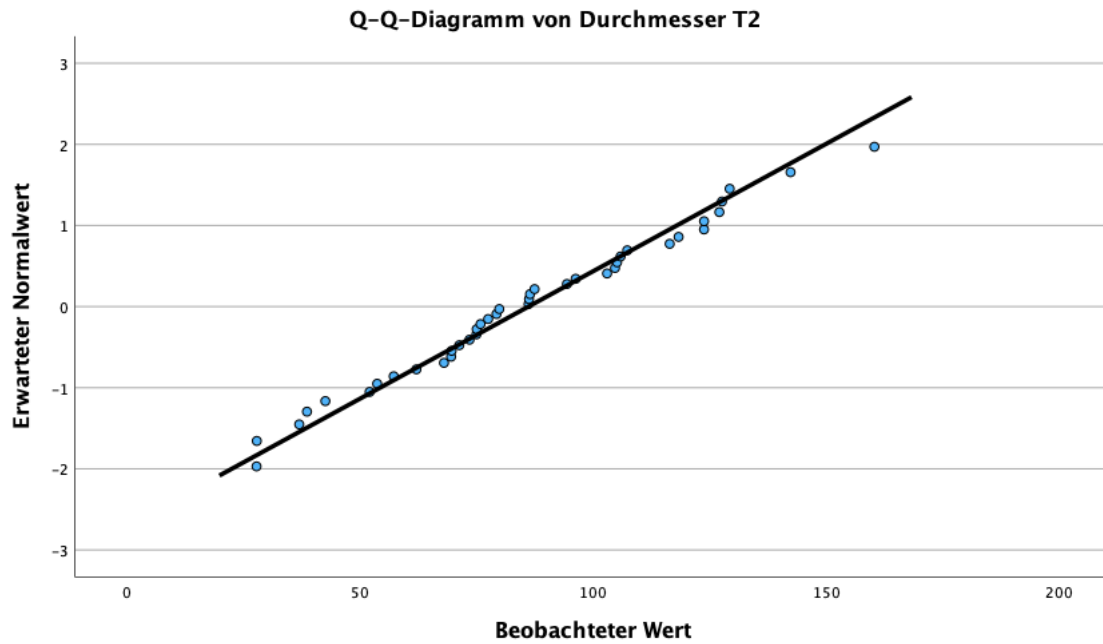


Abbildung 21: Q-Q- Diagramm der Durchmesser der Sphäroide zum Zeitpunkt T2

*Es konnte gezeigt werden, dass die Residuen zum Zeitpunkt T2 grob betrachtet auf der Geraden liegen.*

Dies konnte außerdem durch ein Histogramm überprüft werden. Dieses wird in Abbildung 22 gezeigt:

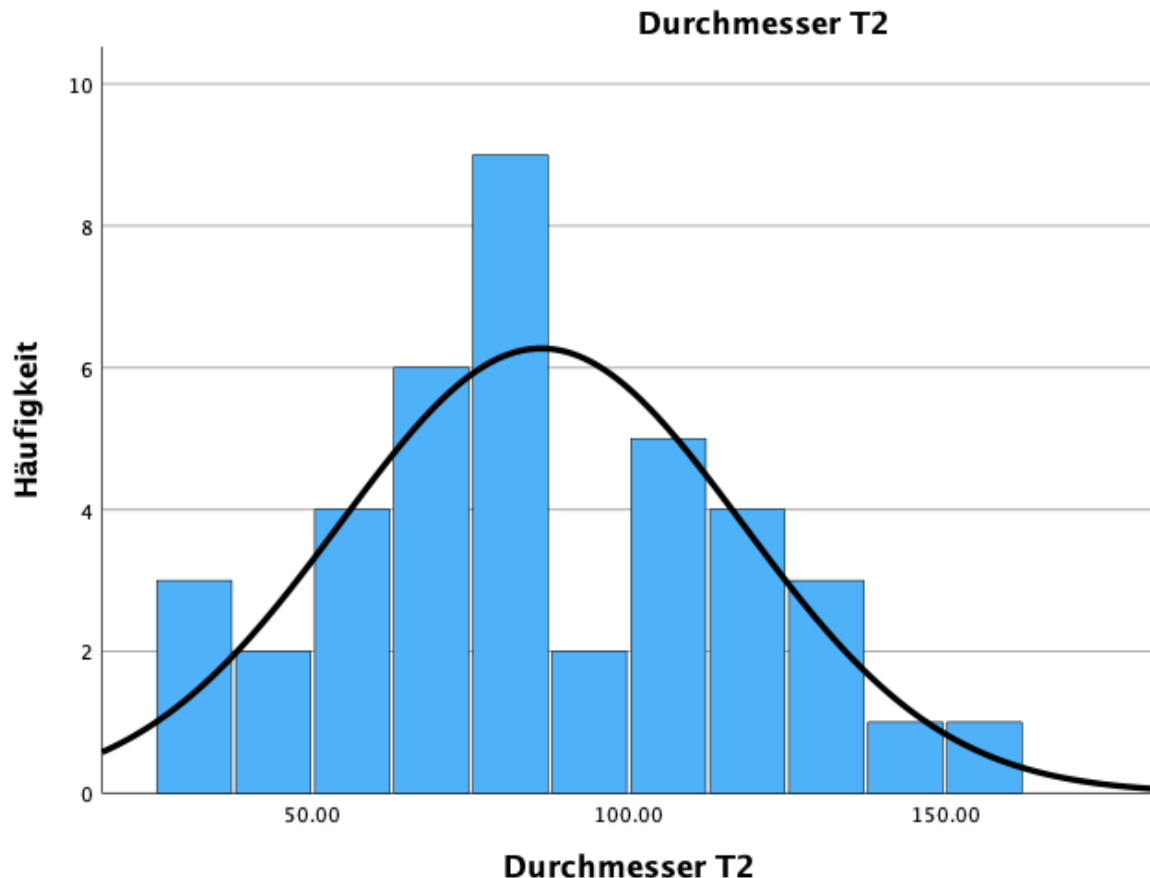


Abbildung 22: Histogramm der Sphäroide zum Zeitpunkt T2

Das Histogramm zeigte, dass die Durchmesser zum Zeitpunkt T2 grob betrachtet einer Normalverteilung entsprechen.

Auch für den Zeitpunkt T0 konnte grob betrachtet eine Normalverteilung festgestellt werden. Die Werte des Durchmessers zum Zeitpunkt T1 wichen leicht von einer Normalverteilung ab. Da eine ANOVA mit Messwiederholung berechnet wurde, konnte man von Robustheit gegenüber der Verletzung der Normalverteilungsannahme ausgehen.<sup>165</sup>

Des Weiteren konnte aufgrund einer Stichprobengröße mit  $n=40$  von einer solchen Robustheit ausgegangen werden. Zur sicheren Überprüfung der Robustheit der Ergebnisse, die nach Berechnung mit der ANOVA dargestellt werden, wurde zusätzlich ein Friedman-Test als nicht-parametrisches Verfahren berechnet.

Der Mauchly-Test auf Sphärizität ergab, dass bei einem  $p = 0,023$  keine Sphärizität vorlag. Für diesen Fall eines signifikanten Mauchly-Tests wurden die Freiheitsgrade bei einem Greenhouse-Geisser-Epsilon von  $\epsilon > 0,75$  mit der Huynh-Feldt-Korrektur und bei einem Greenhouse-Geisser-Epsilon von  $\epsilon < 0,75$  mit der Greenhouse-Geisser-Korrektur angepasst.

Das Fehlen von Ausreißern konnte mit einem Boxplot überprüft werden. Dabei wurden vorhandene, extreme Ausreißer von SPSS als Sternchen gekennzeichnet. Nicht-extreme Ausreißer wurden mit einem Punkt dargestellt. Exemplarisch wurde dies für den Zeitpunkt T2 in Abbildung 23 dargestellt:

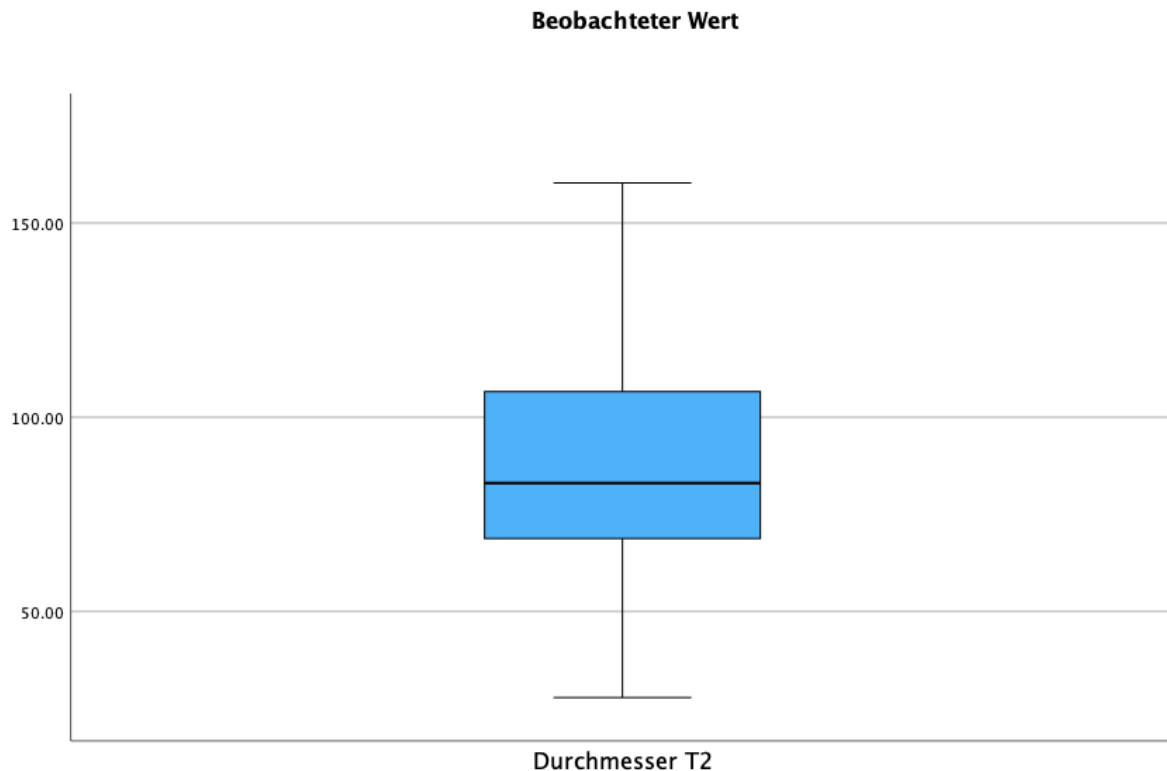


Abbildung 23: Boxplot zu den Durchmessern der Sphäroide zum Zeitpunkt T2

*Es konnte festgestellt werden, dass zum Zeitpunkt T2 keine Ausreißer vorlagen. Dies konnte für die Zeitpunkte T0 und T1 ebenso bestätigt werden.*

#### **4.9.2.2 Ergebnisse der Durchmesserbestimmung der Sphäroide**

Abbildung 24 stellt die gemessenen Durchmesser der Sphäroide graphisch dar:

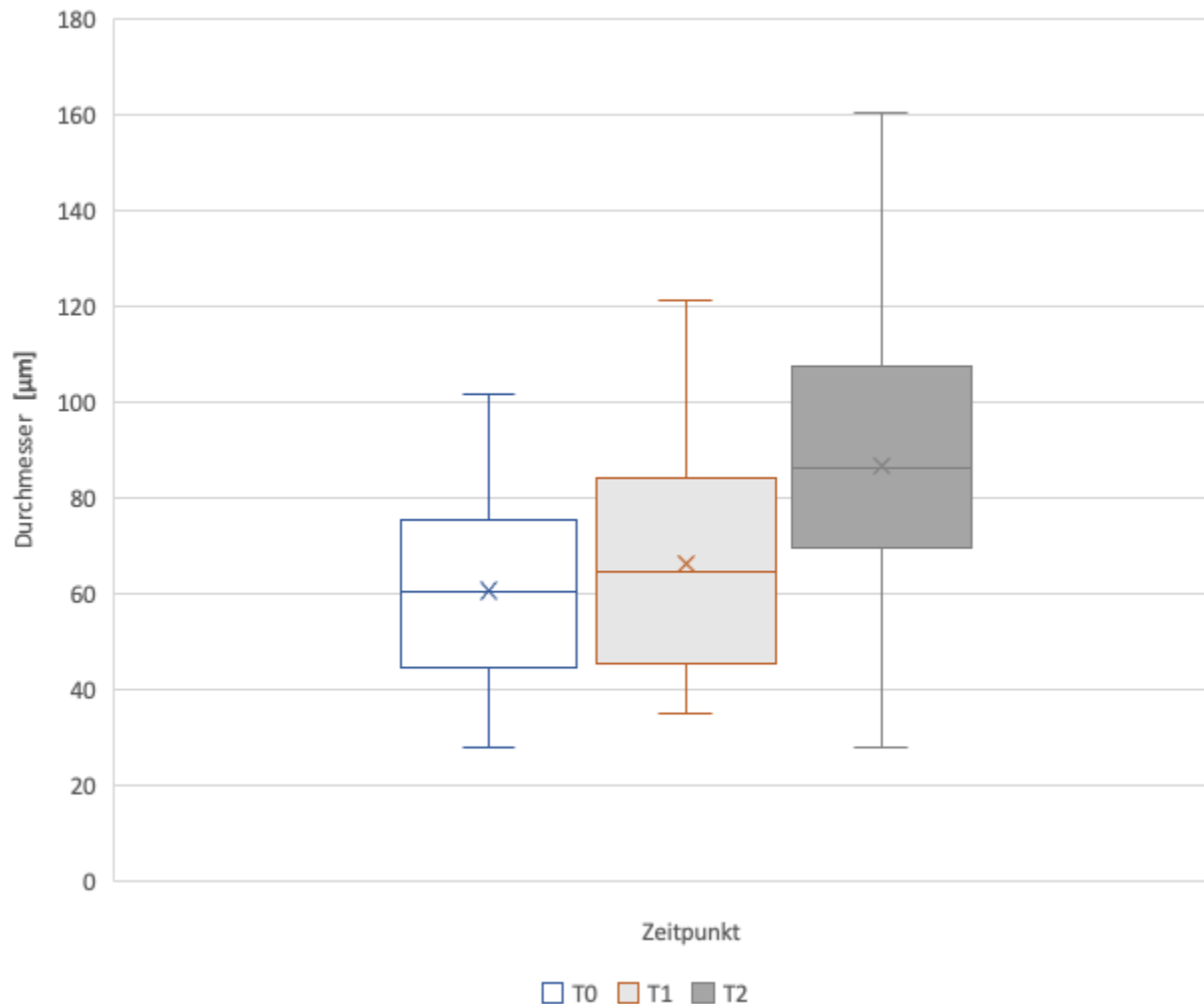


Abbildung 24: Darstellung der Durchmesser der Sphäroide (Gruppe S) in Abhängigkeit der Messzeitpunkte

Der Mittelwert des Durchmessers bei T0 betrug  $60,96\mu\text{m} \pm 20,26\mu\text{m}$ , bei T1  $61,52\mu\text{m} \pm 23,29\mu\text{m}$  und bei T2  $86,15\mu\text{m} \pm 31,81\mu\text{m}$ . Das 95%-Konfidenzintervall lag bei T0 zwischen  $54,48\mu\text{m}$  und  $67,44\mu\text{m}$ . Für den Zeitpunkt T1 lag dieses zwischen  $48,07\mu\text{m}$  und  $74,97\mu\text{m}$  und für T2 zwischen  $75,97\mu\text{m}$  und  $96,33\mu\text{m}$ .

Schaute man sich die höchsten und niedrigsten gemessenen Durchmesser an, so stellte man für die Gruppe T0 ein Minimum von  $27,88\mu\text{m}$  und ein Maximum von  $101,45\mu\text{m}$  fest. Die Differenz bzw. die Spannweite betrug somit  $73,57\mu\text{m}$ . Der niedrigste gemessene Durchmesser lag zum Zeitpunkt T1 bei  $34,86\mu\text{m}$  und der größte gemessene Durchmesser bei  $121,07\mu\text{m}$ , was einer Spannweite von  $86,21\mu\text{m}$  entsprach. Das Minimum zum Zeitpunkt T2 lag bei  $27,83\mu\text{m}$  und das Maximum bei  $160,33\mu\text{m}$ . Dies ergab eine Spannweite von  $132,50\mu\text{m}$ .

Damit überprüft werden konnte, ob sich die Durchmesser der Sphäroide zu den Zeitpunkten unterschieden, wurde eine ANOVA berechnet. Es konnte ein signifikanter Haupteffekt für den Faktor Zeitpunkt mit  $F(1,76; 68,77) = 11,59$  sowie  $p < 0,001$  und  $\eta^2 = 0,23$  gefunden werden.

Die Post-hoc-Vergleiche wurden mittels paarweiser t-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt. Die p-Werte wurden dabei automatisch durch SPSS Bonferroni-korrigiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Durchmesser zwischen T0 und T1 mit  $p = 0,378$  nicht signifikant voneinander unterschieden.

Dahingegen konnte festgestellt werden, dass der durchschnittliche Durchmesser zum Zeitpunkt T2 im Vergleich zu T0 mit  $p < 0,001$  signifikant größer war. Die Mittelwertdifferenz betrug dabei  $25,19\mu\text{m} \pm 5,64\mu\text{m}$ . Ein ähnliches Ergebnis konnte man auch sehen, wenn man die durchschnittlichen Durchmesser zu den Zeitpunkten T2 und T1 miteinander verglich. So fiel auf, dass bei einem  $p = 0,015$  der Durchmesser der Sphäroide zum Zeitpunkt T2 mit einer Mittelwertdifferenz von  $18,63\mu\text{m} \pm 6,24\mu\text{m}$  signifikant größer war als bei T1.

Um die Robustheit der Ergebnisse zu prüfen, wurde ergänzend ein Friedman-Test berechnet. Dieser ergab, dass sich einzelne Zeitpunkte voneinander signifikant unterschieden mit  $Q(2)=11,40$  und  $p= 0,003$ . Die Ergebnisse bestätigten die mit der ANOVA gefundenen Unterschiede und unterstreichen somit die Robustheit der Befunde. Im Anschluss wurde ein Dunn-Bonferroni-Test als Post-hoc-Vergleich berechnet. Die durchschnittlichen Durchmesser zu T0 und T1 unterschieden sich hierbei mit  $p = 0,180$  nicht signifikant voneinander. Dahingegen zeigte sich erneut, dass der Durchmesser zum Zeitpunkt T2 mit  $p < 0,001$  größer war als zum Zeitpunkt T0. Ebenso zeigte sich, dass der Durchmesser zum Zeitpunkt T2 mit  $p = 0,044$  größer war als zum Zeitpunkt T1.

Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass sich das lichtmikroskopische Bild der Sphäroide nach dem Auftauen (T1 und T2) als heterogen präsentierte. So wurde lediglich der Durchmesser von intakten Sphäroiden bestimmt. Eine Messung der Sphäroide, die eine unscharfe Begrenzung aufwiesen, erlaubte in diesen Fällen keine präzise Bestimmung des Durchmessers. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden.

#### **4.10. Morphologie der Zellen**

Die Morphologie ausgewählter Zellen kann der Abbildung 25 entnommen werden:

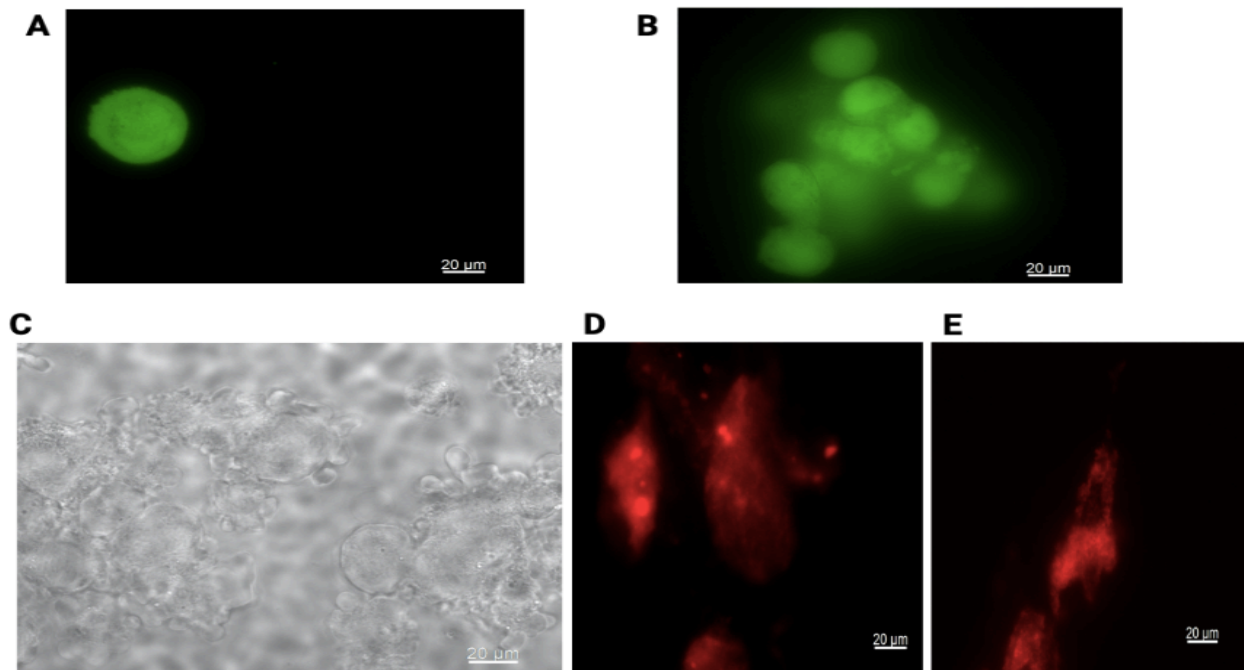


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

*Die Abbildung 25 wurde mit Biorender.com erstellt.*

*Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Einzelzelle vor dem Einfrieren (A) und eines dreidimensionalen Aggregats vor dem Einfrieren (B), eine lichtmikroskopische Aufnahme eines dreidimensionalen Aggregats unmittelbar nach dem Auftauen (C) sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aufgetauter toter Zellen (D) und trypsinierter Zellen (E).*

Eine lebendige Einzelzelle zeichnete sich durch eine intakte Membranintegrität aus, welche anhand einer scharfen Randbegrenzung erkennbar war. Das Zellinnere erschien homogen und die Zelle hatte in der Einzelzellsuspension eine annähernd runde Form. Des Weiteren stellte sich eine lebendige Zelle in der Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit Calcein AM grün dar (A).

In einem dreidimensionalen Aggregat ließen sich zwar einzelne Begrenzungen der Zellen erkennen, jedoch waren diese deutlich schwieriger zu identifizieren, insbesondere im Vergleich zu einer Einzelzelle. Die Zellen ließen sich nicht alle in einer Ebene scharf begrenzt darstellen. Dies kann durch ihre dreidimensionale Konfiguration begründet werden. Das dreidimensionale Aggregat stellte sich vor dem Einfrieren fluoreszierend grün dar, sodass von lebendigen Zellen ausgegangen werden konnte. Es ist anzumerken, dass das Anfärben eines dreidimensionalen Aggregats längere Zeit in Anspruch nahm, damit auch das Zellinnere vom Calcein AM perfundiert werden konnte. So konnte illustriert werden, dass die äußeren Randbereiche des dreidimensionalen Aggregats bereits weniger stark grün schienen, weil diese eine höhere Expositionszeit mit dem Farbstoff aufwiesen (B)



In der lichtmikroskopischen Aufnahme eines dreidimensionalen Aggregats unmittelbar nach dem Auftauen ließ sich konstituieren, dass die Membranintegrität stark gestört war. Die Zellgrenzen waren unscharf und Zelltrümmer ließen sich häufiger finden. Des Weiteren schien die dreidimensionale Konfiguration der Zellen nach dem Auftauen gestört (C).

Wurde die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der aufgetauten, toten Zellen betrachtet, so konnte die scharf begrenzte, runde Form der Zelle nicht mehr wiedererkannt werden. Insbesondere der Zellrand der toten Zelle wirkte ausgefranst. Die Zellen wiesen somit eine unregelmäßige Morphologie auf und erschienen durch das Anfärben mit Ethidium-Homodimer-1 in der Fluoreszenz rot, sodass hier von toten Zellen ausgegangen werden konnte (D).

Einen ähnlichen Effekt ließ sich bei Zellen, welche mit Trypsin inkubiert wurden, feststellen. Diese wiesen eine ähnliche, unregelmäßige Morphologie auf und präsentierten sich durch die rote Fluoreszenz als avital (E).

Abbildung 26 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme ausgewählter Zellen:

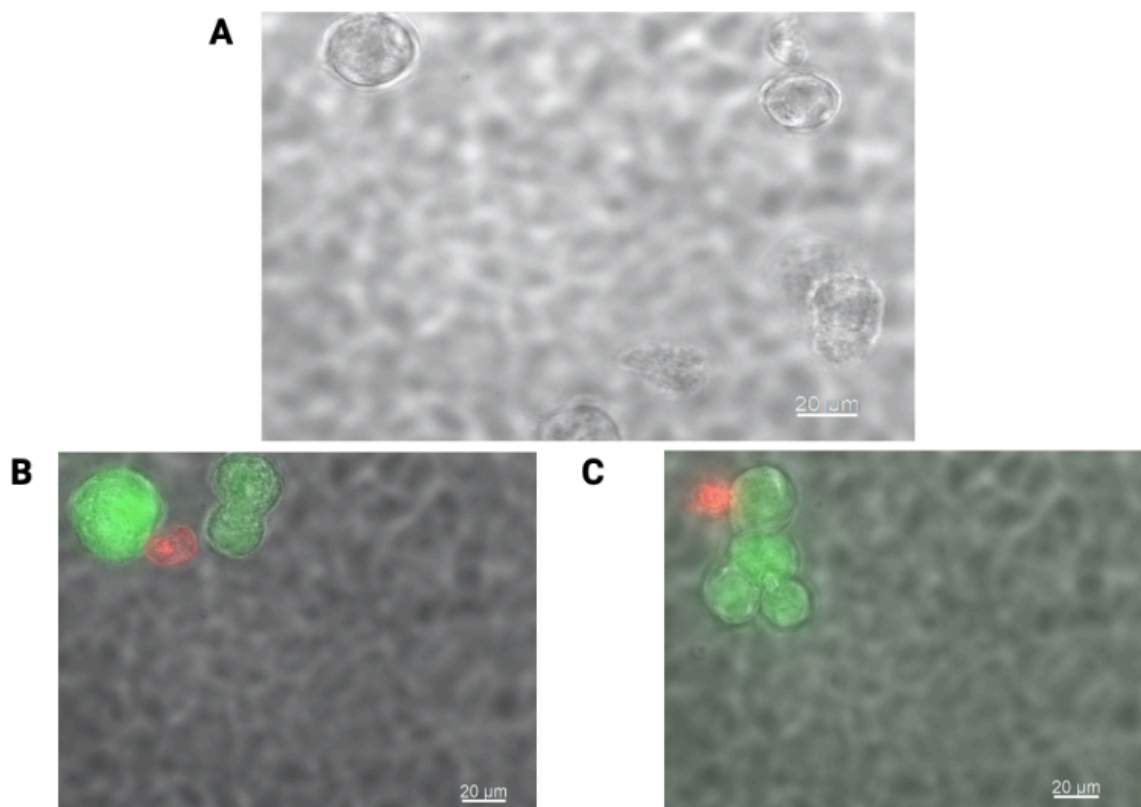


Abbildung 26: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

*Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.*

*Die Abbildung zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von aufgetauten hiPSCs als Einzelzellen (A) sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hiPSCs (B und C).*

So konnte bereits in der lichtmikroskopischen Aufnahme durch alleinige Betrachtung der Morphologie vorausgesagt werden, ob die Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit vital oder avital war. Im ersten Bild wies die Zelle oben links eine scharfe Randbegrenzung auf, was auf eine intakte Membranintegrität hinweist. Des Weiteren präsentierte sich die Zelle homogen und rund, sodass sie bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung vermutlich grün bzw. lebendig erscheinen wird. Im Kontrast dazu stellten sich die Zellen unten rechts im Bild inhomogen dar und wiesen eine unregelmäßige Morphologie auf. Die unscharfe Randbegrenzung indizierte hier eine gestörte Membranintegrität, sodass diese Zellen in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung vermutlich rot bzw. tot dargestellt werden (A).

In dieser Aufnahme wurde exemplarisch eine tote Zelle neben lebendigen Zellen dargestellt. So fielen neben den bereits beschriebenen morphologischen Auffälligkeiten auch der kleinere Durchmesser der toten Zelle auf (B)

Dies konnte in der nächsten Aufnahme erneut bestätigt werden. Besonders deutlich wurde hier die unregelmäßige Morphologie der toten Zelle, sodass man hier von einem Zelltrümmer sprechen konnte (C).

Lichtmikroskopische Aufnahmen ausgewählter Sphäroide können in der Abbildung 27 gezeigt werden:

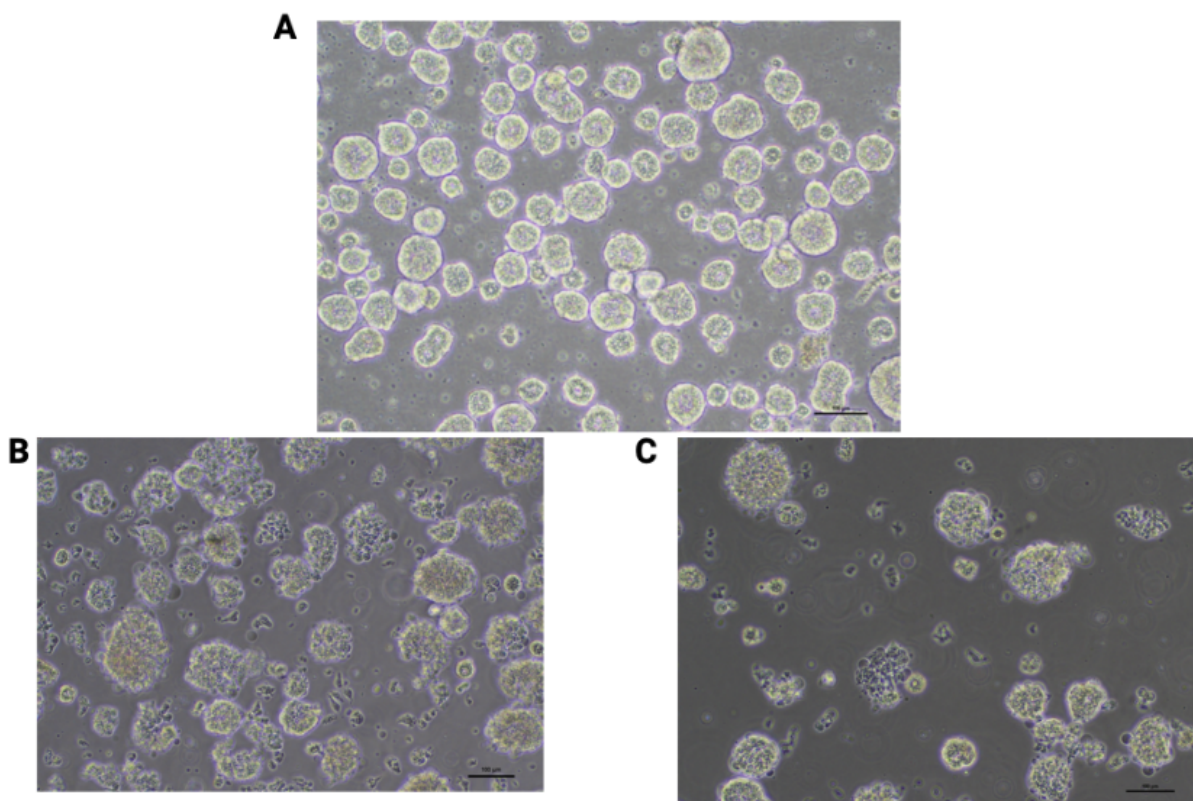


Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Sphäroide (Gruppe S)

*Die Abbildung wurde mit Biorender.com erstellt.*

*Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Sphäroide (Gruppe S) zum Zeitpunkt T0 (A), T1 (B) und T2 (C).*

Zunächst sollte erwähnt werden, dass es sich bei dem Maßstab unten rechts in den Fotos um 100µm handelte.

Bei Betrachtung der Morphologie der Sphäroide (*embryoid bodies*) ließ sich zum Zeitpunkt T0 (A) feststellen, dass die Sphäroide eine regelmäßige Begrenzung aufwiesen, was auf eine intakte Membranintegrität schließen ließ. Außerdem erschienen die Sphäroide in ihrem Durchmesser homogener und zeigten eine homogenere Morphologie. Des Weiteren ließ sich lichtmikroskopisch eine höhere Dichte an Sphäroiden pro Gesichtsfeld erkennen.

Zum Zeitpunkt T1 (B) präsentierte sich ein heterogenes Bild. So ließen sich mehrere Sphäroide mit einer unscharfen Begrenzung finden. Diese erschienen wesentlich kleiner als jene Sphäroide mit scharfer Begrenzung. Das Zellbild war folglich unregelmäßig und die Größenvariabilität nahm visuell betrachtet zu. Des Weiteren konnte eine Abnahme in der Dichte an Sphäroiden pro Gesichtsfeld erkannt werden.

Zum Zeitpunkt T2 (C) nahm die Dichte an Sphäroiden pro Gesichtsfeld noch stärker ab, sodass die Kolonien weniger kompakt erschienen. Es konnte zwischen einzelnen, großen Sphäroiden eine Vielzahl an kleinen Zelltrümmern mit unregelmäßiger Begrenzung festgestellt werden. Das lichtmikroskopische Bild präsentierte sich insgesamt unregelmäßiger.

## 5. Diskussion

### 5.1. Allgemeiner Effekt der Kryokonservierung

In dieser Studie konnten die Effekte der Kryokonservierung anhand der Gruppe A2 exemplarisch dargestellt werden. Zunächst fiel auf, dass nach der Kryokonservierung das Zellüberleben abnahm. Dies spiegelte sich zum einen in den Überlebensraten wider. Vergleich man die Basis Überlebensrate mit der absoluten Überlebensrate, so konnte beobachtet werden, dass das Zellüberleben bei T1 abnahm. Dies konnte bei Betrachtung der Histogramme der Gruppe A2 bestätigt werden. So konnten eine Abnahme und eine Linksverschiebung des durchschnittlichen Durchmessers der lebendigen und toten Zellen zum Zeitpunkt T1 observiert werden. Dies zeigte sich darüber hinaus in der Verschiebung des 95% Konfidenzintervalls zu niedrigeren Bereichen hin. Bei Betrachtung der Morphologie stellte man fest, dass Zellen vermehrt eine unscharfe Randbegrenzung sowie eine unregelmäßige Morphologie aufwiesen. Dies deutete auf eine gestörte Membranintegrität hin.

Auch bei der Kryokonservierung von Oozyten sind morphologische Veränderungen beschrieben worden. Dazu gehörten unregelmäßig geformte Nuclei, eine rupturierte Zellmembran, die Vakuolisierung des Zytoplasmas, die Vergrößerung perinukleärer Zysternen und die vermehrte Kondensierung von Chromatin. Mitochondrien zeigten ein generelles Anschwellen sowie eine Dislokation vom perinukleären Bereich mit vergrößerten Cristae.<sup>137</sup> Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Zellen nach der Kryokonservierung morphologische Veränderungen aufwiesen. Inwiefern sich die Zellorganellen der hiPSCs durch die hier angewandten Protokolle veränderten, ließ sich lichtmikroskopisch nicht evaluieren.

Auffällig war, dass die Zellen sich nicht direkt von der Kryokonservierung erholten. So konnte eine Abnahme der absoluten Überlebensraten für alle Gruppen 24h nach der Kryokonservierung beobachtet werden. Dies spiegelte sich in einer negativen Proliferationsrate wider.

Eine Inhibierung der physiologischen Proliferationsrate nach einem Kryokonservierungszyklus konnte bereits 2011 festgestellt werden.<sup>30</sup> Zudem wird von mehreren Studien die Hypothese aufgestellt, dass die Gefrierschäden das adäquate Anheften der Zellen verhindern.<sup>27,30</sup> Es konnte dargestellt werden, dass eine gestörte Membranintegrität eine adäquate Zell-Substrat-Adhäsion und Zell-Zell-Adhäsion erschwert.<sup>65</sup>

Ein Grund für die Diskrepanz zwischen absoluter und relativer Überlebensrate kann die Ablösung der frisch aufgetauten Zellen sein. Dies konnte durch eine Studie verdeutlicht werden. Während unmittelbar nach dem Auftauen die hESCs eine intakte Morphologie und ein

adäquates Anheftungsverhalten aufwiesen, konnte bereits nach 30 Minuten eine Ablösung von Einzelzellen beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte nach 24h sein Maximum. Nichtsdestotrotz konnte eine vollständige Genesung der Morphologie der hESCs nach 5 Tagen Kultivierung festgestellt werden. Zu erwähnen ist jedoch, dass die Anzahl der Kolonien im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war.<sup>30</sup> Um den Effekt der Ablösung zu minimieren, wird das Benutzen von Matrigel für hiPSCs empfohlen.<sup>166</sup> Dies wurde bereits durch eine einstündige Inkubation der Platten mit Matrigel in der Methodik berücksichtigt.

Das Ansteigen der relativen Überlebensraten 24h nach dem Auftauen konnte unter den kryokonservierten Gruppen für die Gruppen A1, A2 und C gezeigt werden. Interessanterweise handelte es sich bei diesen drei Gruppen deskriptiv betrachtet um jene mit den höchsten absoluten Überlebensraten. Der beobachtete Anstieg der relativen Überlebensrate könnte trotz negativer Proliferationsrate demnach als ein langsames Erholen der Zellen von der Kryokonservierung interpretiert werden.

Ein zellschädigender Effekt der Kryokonservierung ist bereits seit längerer Zeit bekannt.<sup>69</sup> Anhand der Gefrierschäden lässt sich erklären, warum die absolute Überlebensrate nach der Kryokonservierung erniedrigt war. Als wichtigste Mechanismen seien die osmotische Schädigung der Zellen bei zu langsamer Kühlrate, sowie die Bildung von intrazellulären Eiskristallen bei zu hoher Kühlrate genannt.<sup>69</sup> Weitere Mechanismen, die im Rahmen der Kryokonservierung zum Zelltod beitragen, sind der Workman-Reynold-Effekt, die Rekristallisation und die Devitrifikation.<sup>66,76,77</sup> Aus reproduktionsmedizinischer Forschung konnten noch die Akkumulation von intrazellulärem Calcium und reaktiven Sauerstoffspezies, Hypoxie und die Peroxidation von Lipiden als weitere Gefrierschäden identifiziert werden.<sup>151</sup> Durch Dyshomöostase, insbesondere bei osmotischem und oxidativem Stress sowie dem toxischen Einfluss von Calcium, rupturiert die Membran, welche für das Zellüberleben essenziell ist.<sup>54,55</sup> Dies spiegelte sich ebenso in einer modifizierten Morphologie der Zelle wider. Das daraus resultierende, heterogene Bild der Zellkolonien ging mit erniedrigten absoluten Überlebensraten einher. So ließ sich durch das Ethidium-Homodimer-1 ein erhöhter Anteil an toten Zellen fluoreszenzmikroskopisch feststellen, was sich teilweise bei Betrachtung der vom Cellometer® generierten Histogramme widerspiegelte.

Der Effekt der Kryokonservierung lässt sich jedoch nicht nur auf das Zellüberleben beschränken. Das Beispiel von hiPSC-CMs zeigt, dass eine Hochregulierung von Zellzyklus-Genen und eine teilweise reduzierte Kontraktilität nach der Kryokonservierung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt wurden. Auch im klinischen Alltag kann dies potenzielle Konsequenzen haben. So zeigten hiPSC-CMs nach dem Auftauen eine erhöhte Neigung arzneimittelinduzierter Arrhythmien.<sup>80</sup>

Wird der Effekt der Kryokonservierung diskutiert, so scheint eine generelle Diskussion der Überlebensraten sinnvoll. Oftmals wird in kryobiologischen Studien lediglich die relative Überlebensrate angegeben. Dies setzt jedoch voraus, dass alle Zellen wiedergefunden werden oder die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen wiedergefunden werden, für lebendige und tote Zellen gleich ist. Eine weitere Voraussetzung ist, dass lediglich die Kryokonservierung zu einer Erniedrigung der Überlebensrate geführt hat.<sup>67</sup>

Bereits im Jahre 2000 konnte gezeigt werden, dass tote Zellen Agglomerate bildeten, die man in der Neubauerkammer nicht erfassen konnte. Dies führte zu einer Diskrepanz zwischen der absoluten und der relativen Überlebensrate, zum Vorteil der relativen Überlebensrate.<sup>67</sup>

Eine solche Diskrepanz konnte auch hier festgestellt werden und wird ebenfalls auf die Agglomeration toter Zellen zurückgeführt. Eine Agglomeration toter Zellen kann ebenso als Erklärungsansatz für die beobachtete hohe, relative Überlebensrate aufgeführt werden.

Unter der Voraussetzung, dass tote Zellen mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit erfasst wurden, steigt der relative Anteil der gezählten, lebendigen Zellen. Dies bewirkt eine Erhöhung der gemessenen relativen Überlebensrate.<sup>67</sup>

Da der Effekt der enzymatischen Dissoziation in der absoluten Überlebensrate nicht berücksichtigt wird, wurde die korrigierte Überlebensrate für trypsinisierte Gruppen eingeführt. Die Diskussion der Überlebensraten führt zu der Erkenntnis, dass ein Zusammenspiel aus mehreren Überlebensraten zur Bewertung der Kryokonservierung sinnvoll erscheint.

Bei der Wiederfindungsrate konnte festgestellt werden, dass diese in der Beobachtung für alle kryokonservierten Gruppen zum Zeitpunkt T2 niedriger war als zum Zeitpunkt T1. Dies kann durch die Berechnung der Wiederfindungsrate begründet werden. Die Wiederfindungsrate bezieht sich für T1 und T2 auf einen Standard an Zellen, der zum Zeitpunkt T0 gemessen wird ( $N_{\text{insgesamt}}$ ). So erklärt eine negative Proliferationsrate, warum bei T2 die Wiederfindungsrate der Zellen weiter sinkt.

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht alle ursprünglich eingefrorenen Zellen nach der Kryokonservierung wiedergefunden werden können. Dabei wurde der Monolayer nach dem Auftauen mit Trypsin inkubiert.<sup>67</sup>

Außerdem konnte die Tendenz festgestellt werden, dass die Wiederfindungsrate in jenen Gruppen höher war, welche eine vergleichsweise hohe absolute Überlebensrate aufwiesen. Grob zeigte sich: Je höher die absolute Überlebensrate, desto höher die Wiederfindungsrate. Dies widerspricht der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit, wiedergefunden zu werden, für alle Zellen – unabhängig von der Vitalität – gleich sei. Demnach konnte hier beobachtet werden, dass tote Zellen eine niedrigere Wahrscheinlichkeit aufwiesen, wiedergefunden zu werden. Dies konnte ebenfalls für epidermale Zellen, welche nach der Kryokonservierung

trypsiniert wurden, beobachtet werden.<sup>67</sup> Es ist überdies anzunehmen, dass dasselbe Phänomen ebenso für kryokonservierte Gruppen gilt, die nicht mit Trypsin inkubiert wurden. Damit die relative Überlebensrate nicht als falsch-hoch bewertet wird, wurde die adaptierte Überlebensrate eingeführt. Diese wertet nicht-wiedergefundene Zellen als tot. Es sollte erwähnt werden, dass die absolute Überlebensrate dies für den Zeitpunkt T1 bereits ausdrückt, sodass die Berechnung der adaptierten Überlebensrate lediglich für T2 sinnvoll erschien. Die adaptierte Überlebensrate korreliert jedoch nicht zwingend mit der Wiederfindungsrate. Der Grund dafür ist die Berechnung der beiden Parameter. Bei der adaptierten Überlebensrate setzt sich der Wert der nicht-wiedergefundenen Zellen ( $N_{\text{kryo,nichtwiedergefunden}}$ ) aus der Differenz zwischen gezählten Zellen zwischen T1 und T2 zusammen. Dahingegen bezieht sich die Wiederfindungsrate auf die Anzahl an Zellen vor der Kryokonservierung ( $N_{\text{insgesamt}}$ ). Demnach stellt die adaptierte Überlebensrate einen Bezug zum Zeitpunkt T1 und die Wiederfindungsrate zum Zeitpunkt T0 her, sodass beide Parameter unterschiedliche Inhalte berücksichtigen.

Die oben genannten Aspekte verdeutlichten das diverse Spektrum der Effekte einer Kryokonservierung. Viele molekulare Mechanismen der Kryokonservierung gelten als verstanden, jedoch zeigt der zytotoxische Effekt der Kryokonservierung, dass es einer Optimierung bestehender Protokolle und somit weiterer Studien bedarf.

## 5.2. Vergleich zweier Kryomedien

Der Vergleich der Gruppe A1 mit der Gruppe A2 ermöglichte es, die zwei verschiedenen Gefrierschutzlösungen zu vergleichen, da sich die Gruppen lediglich in diesem Aspekt voneinander unterschieden. Die Endkonzentration von DMSO im Kryoröhrchen der Gruppe A1 betrug 10% (v/v). Dahingegen wurde für die Gruppe A2 ein Einfriermedium aus dem gynäkologischen Protokoll verwendet. Dieses bestand aus 6% (v/v) DMSO, 6% (v/v) Ethylenglykol und 0,15M Saccharose.

Es konnte beobachtet werden, dass die absolute Überlebensrate der Gruppe A2 für die Zeitpunkte T1 und T2 jeweils höher war als für die Gruppe A1. In beiden Gruppen konnte eine Abnahme der absoluten Überlebensrate 24 Stunden nach dem Auftauen observiert werden, was sich in der negativen Proliferationsrate widerspiegelte. Diese hielt sich für beide Gruppen auf einem annähernd gleichen Niveau. Unter den kryokonservierten Gruppen konnte für die Gruppe A2 über beide Zeitpunkte hinweg die höchste und für die Gruppe A1 die zweithöchste absolute Überlebensrate beobachtet werden.

Auffällig war, dass unter den kryokonservierten Gruppen lediglich bei den Gruppen A1 und A2 (sowie C) ein leichter Anstieg der relativen Überlebensrate zu T2 beobachtet werden konnte. Auch die Durchmesser der lebendigen und toten Zellen stiegen für die Gruppe A2 nach 24-

stündiger Proliferation. Einerseits sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Kryokonservierung einen längerfristigen Effekt auf die Zellen hat, der über den Zeitpunkt T1 hinausging. Durch die beobachtete Abnahme der absoluten Überlebensrate zu T2 ist davon auszugehen, dass sich die Zellen innerhalb der ersten 24h nach dem Auftauen nicht vollständig vom Kryokonservierungszyklus erholt haben. Andererseits kann argumentiert werden, dass eine Regeneration aufgrund der beobachteten, leichten Erhöhung der relativen Überlebensrate und des Durchmessers zu T2 bereits begonnen hat.

Des Weiteren fiel bei Beobachtung der Wiederfindungsrate auf, dass diese für die Gruppe A2 unter den kryokonservierten Gruppen am höchsten und für die Gruppe A1 am zweithöchsten war. Die Zellen der Gruppe A2 wiesen außerdem von allen eingefrorenen Gruppen am ehesten eine intakte Membranintegrität auf. Morphologisch unterschieden sich die Zellen der Gruppe A2 jedoch nicht sehr von den Zellen der Gruppe A1. Verglich man die Histogramme der beiden Gruppen zum Zeitpunkt T1, so fiel eine Linksverschiebung der Durchmesser der lebendigen und toten Zellen der Gruppe A1 auf.

Ein Vergleich der beiden Kryomedien zeigte, dass in beiden DMSO enthalten war, wobei die Konzentration des Dimethylsulfoxids im Einfriermedium der Gruppe A1 höher war. Eine niedrigere DMSO-Konzentration könnte als ein Grund für die höheren, absoluten Überlebensraten der Gruppe A2 betrachtet werden.

DMSO hat eine Vielzahl an Effekten auf Organismen. So wird DMSO eine generelle Zytotoxizität zugeschrieben.<sup>117</sup> Eine Studie konnte zeigen, dass unter den Gefrierschutzmitteln DMSO, Ethylenglykol, Propylenglykol und Glycerol das DMSO für iPSCs die höchste Toxizität aufwies.<sup>167</sup> DMSO wird unter anderem für eine Zelldifferenzierung von embryonalen Stammzellen zu mesodermalen Zellen benutzt.<sup>168</sup> Nach einem Kryokonservierungszyklus mit einer langsamen Einfrierrate und DMSO konnte gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen eine vermehrte Zelldifferenzierung aufwiesen.<sup>92</sup> Eine Inokulation von DMSO in Mäusen führte ebenso zu erhöhten Raten von Apoptosen in neuronalen Zellen.<sup>169,170</sup> Auch bei den Oozyten von Mäusen führte DMSO zu Veränderungen, indem es die Organisation der Mikrofilamente beeinflusste.<sup>171</sup> In Krebszellen des Kolons bewirkte DMSO eine verminderte Konzentration von Cholesterylestern und eine Veränderung der Oxidation.<sup>172</sup> Die Folgen können eine induzierte Zelldifferenzierung und eine Veränderung der mRNA Transkription sein.<sup>173</sup> Interessanterweise konnte eine Reduktion des DMSO von 10% auf 7,5% eine erhöhte Anzahl an Kolonien bei hämatopoetischen Stammzellen bewirken.<sup>174</sup> Folglich scheint eine Reduzierung der Konzentration des Dimethylsulfoxids sinnvoll.<sup>175</sup> Dies wurde in dem gynäkologischen Einfriermedium berücksichtigt, da dieses lediglich 6% (v/v) DMSO enthielt. Die genannten negativen Auswirkungen des Dimethylsulfoxids sowie die beobachtbar höheren, absoluten Überlebensraten der Gruppe A2 begründen, warum das gynäkologische



Einfriermedium für alle Gruppen, außer der Gruppe A1, benutzt wurde. So decken sich die hier dargestellten Ergebnisse mit den bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen und bekräftigen die Tendenz, die DMSO-Konzentration im Gefrierschutzmedium zu senken.

Interessanterweise konnte dargestellt werden, dass bei der Kryokonservierung von iPSCs unter den vier Gefrierschutzmitteln DMSO, Glycerol, Propylenglykol und Ethylenglykol die höchste Toxizität DMSO und die zweithöchste Ethylenglykol aufwies. Glycerol zeigte die geringste Toxizität. Dahingegen präsentierte sich bei der Kryokonservierung von kleinen iPSC-Klumpen, dass DMSO und Ethylenglykol den besten Zellschutz boten, während Glycerol am wenigsten protektiv wirkte.<sup>167</sup> Dieses Beispiel soll illustrieren, dass ein optimales Gleichgewicht zwischen Toxizität und Kryoprotektion gefunden werden muss. So kann die Komplexität der Problematik der Kryokonservierung unterstrichen werden.

Insgesamt kam man jedoch zu dem Ergebnis, dass der eigentliche Kryokonservierungsprozess in einem höheren Ausmaß an dem geringen Zellüberleben beteiligt ist als das Einfriermedium.<sup>27</sup>

Neben unterschiedlich hohen DMSO-Konzentrationen war ebenso auffällig, dass FBS im Kryomedium der Gruppe A1 enthalten war.

Idealerweise sollte auf den Zusatz von Tierseren verzichtet werden, da diese das Risiko von Infektionen erhöhen. Dies liegt darin begründet, dass tierische Seren potenziell unbekannte Pathogene enthalten, die bei der klinischen Anwendung eine mögliche Infektion provozieren könnten.<sup>116</sup> Außerdem ist die chemische Zusammensetzung des FBS nicht genau definiert, was die Standardisierung von Kryokonservierungsprotokollen erschwert.<sup>65</sup> Eine klinische Anwendung der hiPSCs würde eine xenofreie Kryokonservierung voraussetzen.<sup>27</sup> So wurde bereits 2001 eine Methode der Kryokonservierung für hESCs entwickelt, bei der statt FBS humanes Serumalbumin verwendet wurde. Dabei wurden versiegelte Strohhalme verwendet, welche einen Crosstransfer der Pathogene mit Flüssigstickstoff verhinderten.<sup>109</sup>

In einer anderen Studie wurde ein Gefrierschutzmittel namens STEM-CELLBANKER™ entwickelt, welches aus 10% DMSO, einem hochmolekularen Polymer sowie Glucose und PBS bestand. Mit diesem Gefrierschutzmittel wurden sowohl hESCs als auch iPSCs langsam eingefroren und schnell aufgetaut. Anschließend fand ein Waschschriff mit NaCl statt. Nach einer Zentrifugation fand ein Ausplattieren der Zellen auf eine Feeder-Schicht mit humanen, mitotisch inaktiven Fibroblasten statt. So konnte eine xenofreie Kryokonservierung gelingen. Dieses Verfahren wurde sowohl für hESCs als dreidimensionale Aggregate als auch für iPSCs als Einzelzellen entwickelt.<sup>176</sup>

Die xenofreie Kryokonservierung bietet weitere Vorteile. Durch xenofreie Kryokonservierung konnte unter anderem eine Hochregulierung von SERCA2A und RYR2 festgestellt werden, welche für die Funktionalität der Kardiomyozyten wichtig sind.<sup>177</sup>

Ein anderes Kryomedium, das auf tierische Seren und DMSO verzichtete, wurde in einer Studie vorgestellt. Dieses bestand aus Diolkomponenten, welche DMSO und FBS ersetzen sollten. Genaue Bestandteile des Kryomediums waren die Euro-Collins Lösung mit 40% (v/v) Ethylenglykol und 10% (w/v) Polyethylenglykol. Die hiPSCs, welche mit dem sogenannten VS2E Medium kryokonserviert wurden, wiesen eine Expression der Pluripotenzmarker Oct-3/4 und SSEA-4 sowie eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase auf. Zudem konnte die Funktion der Pluripotenz durch die Formierung von Teratomen nach Transplantation der kryokonservierten hiPSCs in immunvon denupprimierten Mäusen nachgewiesen werden. Ein weiterer Vorteil bestand in der beschleunigten Subkultivierung der Zellen, welche bereits 3 Tage nach dem Auftauen möglich war. Für mit DMSO kryokonservierte hiPSCs dauerte dies 3-4 Wochen. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass die Überlebensraten der verglasten, mit VS2E behandelten hiPSCs durchschnittlich im Bereich von ca. 30% lagen.<sup>116</sup>

Auch in einer anderen Studie schaffte man es, eine effektive Gefrierschutzlösung zu implementieren, welche auf den Zusatz von DMSO verzichtete. Nachteil der Methode war jedoch, dass auch hier, wie bei den meisten anderen Vitrifikationsprotokollen, lediglich geringe Mengen an hiPSCs (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/mL) eingefroren werden konnten.<sup>178</sup>

Wurde das Einfriermedium aus der Gynäkologie betrachtet, so fällt auf, dass unter anderem Ethylenglykol als Gefrierschutzmittel benutzt wurde.

In einer Experimentreihe konnte gezeigt werden, dass hiPSCs eine Konzentration von 20% Ethylenglykol tolerieren. Eine 40%-ige Ethylenglykolkonzentration führte jedoch zu einer Schädigung der Basalmembran. Insbesondere fiel auf, dass hydrophobe Diolkomponenten mit langen Alkylketten die Doppelmembran schädigten. Eine Ausnahme stellte PEG-200 dar, welches als hydrophiles Molekül eine geringe Interaktion mit der Basalmembran aufwies. Der Vergleich mehrerer Diolen zeigte, dass Ethylenglykol das beste Diol zur Verglasung von hiPSCs ist.<sup>116</sup>

Zudem wurde im gynäkologischen Einfriermedium Saccharose benutzt. Bei Saccharose und Trehalose handelt es sich um Disaccharide.<sup>179</sup> In der Natur gelingt es multizellulären Organismen, zum Beispiel Fröschen oder Nematoden, extreme Austrocknung und das Einfrieren zu überleben.<sup>180,181</sup> So wird die Akkumulation von hohen Mengen an Zuckern mit der Fähigkeit, solche Temperaturen zu überleben, in Verbindung gebracht.<sup>181</sup> Demnach scheint die nähere Betrachtung von Disacchariden als Gefrierschutzmittel interessant.

In einer anderen Studie wurde Trehalose als nicht-penetrierendes Gefrierschutzmittel benutzt. Wurde Trehalose vor dem Schritt des *Ice seedings* benutzt, so diente sie der kontrollierten Prädehydratation der Zelle. Folglich konnte die Konzentration des intrazellulären Wassers

gesenkt werden, was die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der intrazellulären Eisbildung minimierte.<sup>97</sup>

Es konnte ferner gezeigt werden, dass das Hinzufügen von Trehalose zu einer verbesserten Membranintegrität in kryokonservierten fetalen Hautzellen sowie zu einer verbesserten Überlebensrate von hämatopoetischen Vorläuferzellen führte.<sup>182,183</sup> In der Kryokonservierung von hESCs, welche mit 10% DMSO eingefroren wurden, bewirkte das Hinzufügen von Trehalose eine dreifach erhöhte Erholung vom Kryokonservierungszyklus. Dabei konnte kein Einfluss auf die Pluripotenz der hESCs festgestellt werden.<sup>184</sup>

Da es sich bei beiden Stoffen um Disaccharide handelt, welche als nicht-penetrierende Gefrierschutzmittel eingesetzt werden, liegt die Vermutung nahe, dass Saccharose eine ähnliche Wirkung auf die Zellen wie Trehalose hat.

Ähnliche Resultate konnten bei der Kombination von Glycerol mit Saccharose im Kryomedium festgestellt werden. So konnte eine kryostabilisierende Eigenschaft des penetrierenden Gefrierschutzmittels bei Zugabe von Saccharose festgestellt werden. Es wurde ebenso eine erleichterte Diffusion des penetrierenden Gefrierschutzmittels bei Zugabe von Saccharose vermutet.<sup>103</sup>

Inwiefern die hiPSCs von einer Prädehydrierung mit Disacchariden in Kombination mit dem gynäkologischen Kryokonservierungsprotokoll profitiert hätten, bleibt unbeantwortet. Die vielversprechenden Ergebnisse machen eine Inkubation der hiPSCs mit Disacchariden vor dem Einfrieren jedoch attraktiv. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass die hiPSCs von der Saccharose im gynäkologischen Einfriermedium profitierten.

Die Kombination mehrerer Gefrierschutzmittel, insbesondere die Kombination penetrierender mit nicht-penetrierenden Gefrierschutzmitteln, ist Gegenstand aktueller Forschung. So erhofft man sich, die Toxizität von penetrierenden Gefrierschutzmitteln zu reduzieren.<sup>27</sup>

Bei der Kryokonservierung von hämatopoetischen Stammzellen zeigte sich, dass die Konzentration von DMSO auf ein Viertel reduziert werden konnte, wenn Disaccharide zum Kryomedium hinzugefügt wurden.<sup>179</sup>

Auch die Kombination zweier penetrierender Gefrierschutzmittel hatte einen Einfluss auf das Zellüberleben. Eine Studie konnte darstellen, dass nach der Kryokonservierung von hESCs mit 5% DMSO und 50% FBS die Überlebensrate bei ca. 10% lag. Wurde jedoch 10% Ethylenglykol zum Einfriermedium hinzugefügt, konnte die Überlebensrate verdreifacht werden.<sup>185</sup>

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die beobachtete Verbesserung der Überlebensraten der Gruppe A2 im Vergleich zur Gruppe A1 auf eine Reduzierung von DMSO, eine Kombination mehrerer Gefrierschutzmittel sowie auf den Verzicht auf FBS als

tierisches Serum zurückgeführt werden kann. Dies bildet die Gründe ab, warum für alle anderen kryokonservierten Gruppen das gynäkologische Einfriermedium als Standard eingesetzt wurde.

### **5.3. Auftauen der dreidimensionalen Aggregate mit Trypsin vs. mit einem Zellstrainer**

Damit die Vitalität der dreidimensionalen Aggregate mittels Trypanblau bestimmt werden konnte, musste die Konformation aufgebrochen werden.

Der Vergleich des Zellüberlebens vor und nach Inkubation mit Trypsin (Trypsinkontrollgruppe) zeigte, dass kein statistisch signifikanter Unterschied beim Wilcoxon-Test gefunden werden konnte. Aufgrund der unter anderem geringen Stichprobengröße, der niedrigeren Teststärke und der hohen Mittelwertdifferenz der Überlebensraten liegt die Vermutung nahe, dass die Inkubation mit Trypsin eine Reduktion im Zellüberleben bewirkte.

Auch die Studienlage konnte einen negativen Effekt der Trypsinierung feststellen. Es konnte dargestellt werden, dass eine Inkubation mesenchymaler Stammzellen mit Trypsin für 30 Minuten eine signifikant reduzierte Expression verschiedener Oberflächenmarker, z.B. CD44<sup>+</sup> und CD55<sup>+</sup>, bewirkte.<sup>160</sup> Eine Trypsinierung equiner Chondrozyten bewirkte eine Verringerung der Proliferationsrate und eine Schädigung der Zellmembran. Eine längere Exposition der Zellen mit Trypsin hatte eine umso stärkere Reduktion der Zellviabilität zur Folge.<sup>157</sup>

Ursächlich dafür ist, dass das Trypsin als Protease Peptidbindungen auflöst und so Zellschäden verursacht.<sup>186</sup> Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich bei manchen Zellschäden um irreversible Effekte handelt.<sup>187</sup>

Die Studienlage zur Trypsinierung deckt sich mit den hier beobachteten Ergebnissen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der hiPSCs mit Trypsin eine Veränderung der Morphologie bewirkte, sodass sich die Zellen als unregelmäßig konfiguriert präsentierten. Auch konnte in der Beobachtung eine verringerte absolute Überlebensrate mit einer Mittelwertdifferenz von 66,77% nach der Trypsinierung gezeigt werden. Dies spiegelte sich ebenso in der Linksverschiebung der Durchmesser der lebendigen Zellen nach der Trypsinierung wider. Ferner ließ sich bereits 24h nach der Trypsinierung beobachten, dass sich der Zelldurchmesser der lebendigen Zellen leicht erhöht hatte, was sich in einer Rechtsverschiebung des Histogramms ausdrückte. Auch eine verringerte Proliferationsrate sowie eine niedrige Wiederfindungsrate konnten für die Trypsinkontrollgruppe beobachtet werden.

Aufgrund der bereits beschriebenen, zytotoxischen Effekte des Trypsins wurde die korrigierte Überlebensrate eingeführt. Dadurch konnte der alleinige Effekt der Kryokonservierung auf das Zellüberleben betrachtet werden. Zwar erhöhte sich dadurch die Überlebensrate in einen

höheren Bereich, jedoch diene dies lediglich analytischen Zwecken. Primär sollte die absolute Überlebensrate betrachtet werden. Wichtig zu erwähnen ist, dass keine Positivkontrolle für mechanisch dissoziierte Zellen vorhanden war. Vor allem für trypsinisierte Gruppen war die absolute Überlebensrate zu beiden Zeitpunkten in einem sehr niedrigen Bereich. Auch wenn die Vermutung nahe liegt, dass die Kryokonservierung einen hohen Anteil an der Erniedrigung der Überlebensrate hatte, so senkte die Trypsinierung diese in einen noch niedrigeren Bereich. Demnach schien die enzymatische Dissoziation mit Trypsin nicht geeignet zu sein.

Doch auch die Filterung bzw. die mechanische Dissoziation der dreidimensionalen Aggregate schien einen Einfluss auf das Zellüberleben zu haben. Inwiefern mechanisch induzierter Stress einen Einfluss auf das Zellüberleben haben kann, wurde anhand mechanischer Vibrationen, welcher hiPSCs exponiert wurden, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch die Proliferationsrate und Zelladhäsionen negativ beeinflusst wurden.<sup>188</sup> Überdies konnte für murine ESCs dargestellt werden, dass mechanisch induzierter Stress eine Herunterregulation des Oct-4 Gens bewirkte.<sup>189</sup>

Zur Bestimmung der Basis Überlebensrate wurde teilweise aus einem Monolayer eine Einzelzellsuspension generiert. Hierbei kam die mechanische Dissoziation der Zellen zum Einsatz. Die hohen Basis Überlebensraten konnten zeigen, dass die hiPSCs eine solche Filterung gut überlebten. Es lässt sich an dieser Stelle die Hypothese aufstellen, dass die Zellen nach der Kryokonservierung aufgrund der Gefrierschäden eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber mechanischer Dissoziation aufweisen, was als ein Teilgrund für die beobachtbar erniedrigte absolute Überlebensrate der Gruppen B1 und D1 aufgeführt werden kann. Die aufgeführte These würde sich auch auf die enzymatische Dissoziation übertragen. Inwiefern es sich bei den toxischen Effekten der Kryokonservierung und Dissoziation um eine Addierung oder Potenzierung handelt, gilt es weiter herauszufinden.

Die Gruppen B1 und D1 wiesen zwar beobachtbar höhere absolute Überlebensraten auf als die Gruppen B2 und D2, diese lagen jedoch auch in niedrigen Bereichen. Zieht man die korrigierten Überlebensraten der Gruppen B2 und D2 heran, so beobachtet man, dass diese in einem höheren Bereich lagen als die absolute Überlebensrate zum Zeitpunkt T1 der Gruppen B1 und D1. Der Vergleich kann jedoch nicht als gültig betrachtet werden. Dies liegt darin begründet, dass für die Gruppen B1 und D1 ebenso eine Positivkontrolle hätte erfolgen müssen, bei der die Überlebensraten ohne Kryokonservierung vor und nach der mechanischen Dissoziation analysiert worden wären, um so eine für die mechanische Filterung von Zellen angepasste, korrigierte Überlebensrate einzuführen.

Obwohl inferenzstatistisch kein Unterschied der Überlebensraten zwischen den Gruppen B1 und B2 sowie D1 und D2 festgestellt werden konnte, zeigte sich deskriptiv, dass in beiden Protokollen die absolute Überlebensrate der mechanisch dissoziierten Zellen höher war als jene der trypsinisierten Zellen. Dies wurde auch für die Proliferationsrate beobachtet werden. Hierbei konnten für trypsinisierte Zellen leicht niedrigere Werte observiert werden. Außerdem zeigte sich für alle vier Gruppen eine niedrige Wiederfindungsrate, wobei sich für mechanisch dissoziierte, dreidimensionale Aggregate eine leicht höhere Wiederfindungsrate betrachten ließ. Niedrige Wiederfindungsraten und damit einhergehend niedrige absolute Überlebensraten nach der Kryokonservierung und Trypsinierung konnten ebenso für epidermale Zellen festgestellt werden.<sup>67</sup>

Auffällig ist, dass die trypsinisierten Gruppen im Vergleich zur Trypsinkontrollgruppe eine beobachtbar niedrigere Proliferationsrate aufwiesen. Dies verdeutlichte die Hypothese, dass die alleinige Kryokonservierung die Proliferationsraten von dreidimensionalen Aggregaten zusätzlich erniedrigte.

Zwar konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Proliferationsrate von murinen neuronalen Vorläuferzellen durch die Kryokonservierung nicht beeinträchtigt wurde. Dieses Erkenntnis trat jedoch in Verbindung mit Überlebensraten von 60-70% zumindest 24h nach dem Auftauen auf.<sup>190</sup>

Da sich die Überlebensraten der vier Gruppen maximal auf rund 30% beliefen, kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt der Kryokonservierung auf dreidimensionale Aggregate stärker ist, was sich in den erniedrigten Überlebensraten widerspiegelte.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die relativen Überlebensraten für die Gruppen D1 und D2, jedoch insbesondere für die Gruppen B1 und B2, vor allem zum Zeitpunkt T1 hoch waren. Für die Gruppe B1 konnte zum Zeitpunkt T1 die höchste relative Überlebensrate unter allen kryokonservierten Gruppen observiert werden. Nichtsdestotrotz konnte insbesondere für die Gruppen B1 und B2 eine hohe Mittelwertdifferenz der relativen Überlebensraten zwischen den Messungen T1 und T2 festgestellt werden. Dies spricht für einen längerfristigen Effekt der Kryokonservierung in Kombination mit der Methodik der Dissoziation der Zellen auf die relative Überlebensrate. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, bei der man 6h nach der Kultur zuvor kryokonservierter Zellen den Höhepunkt der Deregulation an Genen, welche den Zelltod steuern, feststellte. Erst 48h nach der Kryokonservierung wurde das Erreichen von Niveaus der Positivkontrollgruppe beschrieben.<sup>30</sup>

Ein genereller Vergleich zwischen der enzymatischen und mechanischen Methode zur Dissoziation von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen zeigte, dass die enzymatische Dissoziation eine erfolgreichere Methode zur Generierung einer Einzelzellsuspension

darstellt.<sup>191</sup> Folglich ist es abhängig vom interessierenden Fokus des Untersuchenden, ob einer möglichst effizienten Dissoziation oder dem Zellüberleben eine höhere Bedeutung zugeschrieben wird. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass sich die absoluten Überlebensraten aller vier Gruppen in einem niedrigen Bereich befanden. Zudem ließ sich beobachten, dass 24h nach dem Auftauen die absolute Überlebensrate weiterhin sank und es bleibt zu klären, wie lange die hiPSCs brauchen, um sich von der Dissoziation und der Kryokonservierung vollständig zu erholen.

Als weiteren Nachteil der enzymatischen Dissoziation mit Trypsin sollte benannt werden, dass eine FBS-haltige Lösung zum Stoppen der Reaktion benutzt wurde. Dies erhöht das Risiko für eine Kreuzkontamination mit Fremdpathogenen.<sup>27</sup> Alternativ besteht die Möglichkeit, Trypsin Inhibitoren zu benutzen.<sup>192</sup>

Im Bereich der Reproduktionsmedizin werden bereits Maschinen, zum Beispiel das Medimachine System, benutzt, um eine standardisierte Methode zur mechanischen Dissoziation von humanem Hodengewebe zu erlangen.<sup>193</sup> Zwar stellt dies eine schnelle Methode der Dissoziation komplexerer Gewebe dar, jedoch bleibt fraglich, inwiefern diese Methodik auf hiPSCs-Aggregate übertragbar ist.

Ein anderer Ansatz ist die Implementierung einer Ruhephase von 24h zwischen der Kryokonservierung und der Trypsinierung. Dies wurde damit begründet, dass das enzymatische Ablösen eines Monolayers direkt nach der Kryokonservierung eine weitere Erniedrigung der Zellüberlebensrate bewirkte.<sup>67</sup> Demnach kann diskutiert werden, dass die Zellen erst zum Zeitpunkt T2 mit Trypsin hätten inkubiert werden können. Dasselbe würde für die enzymatische Dissoziation gelten. Folglich hätten die Zellen eine kurze Zeit, um sich von den Gefrierschäden zu erholen. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass ein unmittelbarer Effekt nicht hätte analysiert werden können.

Nichtsdestotrotz sollte nicht unberücksichtigt gelassen werden, dass der nach der Auswertung angenommene Unterschied zwischen den Gruppen B1, B2, D1 und D2 insbesondere auf deskriptiv-statistischen Beobachtungen basiert. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz dahingehend, dass kryokonservierte hiPSCs-Aggregate eher von einer mechanischen als von einer enzymatischen Dissoziation profitierten, wobei die Überlebensraten für alle vier Gruppen zu beiden Zeitpunkten auf einem sehr niedrigen Niveau lagen.

Abschließend lässt sich sagen, dass es zunächst sinnvoll erscheint, den eigentlichen Prozess der Kryokonservierung zu optimieren, bevor der Vergleich verschiedener Methoden zur Dissoziation dreidimensionaler Aggregate evaluiert wird.

#### **5.4. Kryokonservierung von Einzelzellen vs. dreidimensionalen Aggregaten**

Möchte man untersuchen, ob die Einzelzellsuspensionen oder die 3D-Aggregate ein höheres Zellüberleben aufwiesen, so sollten die Gruppen A1, A2 und C (Einzelzellsuspensionen) jeweils mit den Gruppen B1, B2, D1, D2 und E (3D-Aggregate) verglichen werden.

Bei Betrachtung der absoluten Überlebensrate und der Wiederfindungsrate fiel im Vergleich zu den Gruppen D2 und E bereits auf, dass die Einzelzellsuspensionen zu beiden Zeitpunkten eine auffallend höhere absolute Überlebensrate aufwiesen. Davon ausgenommen war der Vergleich zwischen Gruppe C und D2 zu T2. So fiel auch deskriptiv auf, dass die Einzelzellsuspensionen unabhängig vom verwendeten Protokoll eine höhere Überlebensrate über beide Zeitpunkte hinweg aufwiesen als die restlichen Gruppen, in denen dreidimensionale Aggregate kryokonserviert wurden. Dies spiegelte sich ebenso in der morphologischen Qualität wider. Bei der Proliferationsrate und zum Großteil auch bei der adaptierten Überlebensrate konnte diese Tendenz beobachtet werden, wobei für die Gruppe E eine vergleichsweise hohe Proliferationsrate festgestellt werden konnte. Aufgrund der generell niedrigen Zahl an absolut gezählten Zellen sollte jedoch die Proliferationsrate der Gruppe E mit Vorsicht interpretiert werden.

Auch der Vergleich der Histogramme der Gruppen A2 mit denen der Gruppen B1 und D1 zeigte, dass lebendige Zellen der Gruppe A2 nach der Kryokonservierung einen höheren Durchmesser aufwiesen als jene Zellen der Gruppen B1 und D1. Dies spricht für eine schnellere Erholung der lebendigen Zellen der Gruppe A2. Der Unterschied der Durchmesser toter Zellen wurde insbesondere zum Zeitpunkt T2 deutlich. Hier zeigten die toten Zellen der Gruppe A2 höhere Durchmesser als die Zellen der Gruppen B1 und D1, was eine Agglomeration der toten Zellen indizieren könnte.

Bei Heranziehung der relativen Überlebensraten konnte dies nicht bestätigt werden. Hier konnte in Bezug auf diese Fragestellung kein regelmäßiges Muster erkannt werden.

Die genannten Beobachtungen entsprechen im Groben dem bisherigen wissenschaftlichen Wissensstand. Welche Prozesse dem zugrunde liegen, wird im Folgenden dargestellt.

Zunächst sollte genannt werden, dass die dreidimensionalen Aggregate in dieser Arbeit durch einen Zellschaber generiert wurden. Die mechanischen Scherkräfte könnten folglich ein Absterben der Zellen bewirken.<sup>66</sup>

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist die räumliche Begrenzbarkeit der Zellen im 3D-Aggregat. Zum einen beschränkt dies die potenzielle Fläche, die dem Gewebe zum Ausgleich des osmotischen Gradienten zur Verfügung steht. Zum anderen stehen die Zellen im Inneren des 3D-Aggregats nur im Kontakt mit den um sie herum befindlichen Zellen, wohingegen Zellen in der Einzelzellsuspension einen direkten Austausch mit dem umgebenden Medium haben. Folglich entsteht ein Ungleichgewicht. Während auf die Zellen



im Inneren ein geringerer osmotischer Gradient einwirkt, besteht der generelle Nachteil, dass so längere Expositionszeiten des gesamten 3D-Aggregats mit dem Kryoprotektivum notwendig sind, um ein osmotisches Äquilibrium zu erreichen.<sup>67</sup>

Eine homogene Perfusion der Zellen mit Einfriermedien kann im dreidimensionalen Aggregat kaum gewährleistet werden.<sup>38</sup> Dies zeigte sich morphologisch durch eine inhomogene Anfärbung der Zellen (siehe Abbildung 25, (B)). Auf der anderen Seite sind die Zellen am Äußeren des 3D-Aggregats für eine längere Expositionsdauer den zytotoxischen Eigenschaften des Einfriermediums ausgesetzt.<sup>123</sup>

Dies kann auch durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben werden:

$$J = D \frac{dC}{dx}$$

J: Diffusionsstromdichte (in mol/m<sup>2</sup>s)

D: Diffusionskoeffizient (in m<sup>2</sup>/s)

dC: Veränderung der gelösten Konzentration (in mol/m<sup>3</sup>)

dx: Weglänge des Systems (in m)

So beschreibt die Diffusionsstromdichte den Fluss an Molekülen, die durch eine Querschnittsfläche pro Zeiteinheit diffundieren, senkrecht zur x-Achse.<sup>194</sup> Folglich wird deutlich, dass die Konzentration des Einfriermediums bzw. die Veränderung der gelösten Konzentration, die Austauschfläche sowie die Zeit eine wichtige Rolle bei der Diffusion spielen. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass das Fick'sche Gesetz nicht berücksichtigt, dass das Gewebe seine Größe verändert. Diese Dynamik der Größenveränderung wird auf den osmotischen Gradienten zurückgeführt, der ein Anschwellen bzw. ein Schrumpfen der Zelle bewirken kann.<sup>195</sup>

Ein weiterer Effekt des osmotischen Gradienten ist die begünstigte Entstehung von intrazellulärem Eis durch den verlangsamten Efflux von Wasser. Da es sich bei 3D-Aggregaten um komplexere Systeme handelt, sollte auch die extrazelluläre Eisbildung genannt werden, welche interzelluläre Verbindungen sowie Zell-Matrix-Verbindungen stört.<sup>72</sup>

Doch nicht nur ein osmotischer Gradient wirkt auf die Zellen. Auch ein thermaler Gradient zwischen dem Zentrum und der Peripherie einer Probe wurde bereits beschrieben.<sup>196</sup> Somit ist der Entzug von Wärme im 3D-Aggregat inhomogen.<sup>72</sup> Folglich ist neben der Kühlrate die thermale Uniformität für das Verhindern von Rissen in Geweben durch mechanische Spannung unabdingbar.<sup>125,126</sup>

Überdies werden abhängig von der Konformität der Zellen Unterschiede in den Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten von Gefrierschäden diskutiert. So wurde beschrieben, dass die Wahrscheinlichkeit für intrazelluläre Nukleation durch Zell-Zell-Interaktionen erhöht wird.<sup>127</sup> Dies würde bedeuten, dass Zellen im Gewebe eine generell höhere Vulnerabilität für Gefrierschäden hätten als Einzelzellen.

Demnach wird eine intrinsische Differenz zwischen komplexen Systemen und Einzelzellen diskutiert<sup>67</sup>.

Zwar kann bei Betrachtung der Ergebnisse beobachtet werden, dass Einzelzellsuspensionen höhere absolute Überlebensraten aufwiesen, jedoch erfordert die industrielle und klinische Applikation des *tissue engineering*s eine hohe Quantität an funktionellen Zellen, sodass bestehende Kryokonservierungsprotokolle weiter optimiert werden sollten, bei denen dreidimensionale Aggregate eingefroren werden. Dabei sollte bedacht werden, dass Studien zur zukünftigen Anwendung der hiPSCs im Kontext der regenerativen Medizin mit einer Zellzahl von ca.  $1 \times 10^9$  Zellen pro Patienten und 1L Kryokonservierungssystemen rechnen.<sup>38</sup>

Aufgrund der Tatsache, dass die Verwendung von 3D-Aggregaten eine genaue Einschätzung der Effizienz des Kryokonservierungszyklus nicht erlaubt, erschwert dies den objektiven Vergleich. So wird von anderen Studien die Optimierung der Protokolle von Einzelzellen als Voraussetzung angesehen, um so die Kryokonservierungsprotokolle, bei denen mit 3D-Aggregaten gearbeitet wird, erst verbessern zu können.<sup>27</sup>

Es lässt sich beispielsweise ein Kryokonservierungsprotokoll erwähnen, in welchem eine gemischte Population aus Einzelzellen und dreidimensionalen Aggregaten eingefroren wurde. Dies erreichte man, indem man vor dem Einfrieren die Zellen mit einer Dissoziationslösung inkubierte.<sup>129</sup> Inwiefern dies zu höheren Überlebensraten mit den genannten Protokollen geführt hätte, wäre eine interessante Fragestellung für weitere Arbeiten.

Demnach können mehrere Mechanismen identifiziert werden, die die beobachtete Tendenz des erhöhten Überlebens von Einzelzellen nach der Kryokonservierung bekräftigen können.

## **5.5. Kryokonservierung von Einzelzellen nach dem etablierten Protokoll vs. nach dem gynäkologischen Protokoll**

Eine zentrale Fragestellung dieser Doktorarbeit war der Vergleich zwischen dem etablierten und dem gynäkologischen Protokoll. Um dies zu analysieren, wurden zunächst die Einzelzellsuspensionen miteinander verglichen, damit der Faktor „Einzelzellsuspension versus 3D-Aggregat“ vernachlässigt werden kann. Demnach wurden im Folgenden die Gruppen A1 und A2 mit der Gruppe C verglichen.

Vorab sollte der Faktor Transport thematisiert werden. Der Transport von Zellen oder ganzen Organen kann einen maßgeblichen Einfluss auf den Funktionserhalt des Organismus haben. So zeigt das Beispiel der Herztransplantation, dass die Lagerungs- bzw. die Transportdauer eines Herzens aufgrund des Zelluntergangs auf vier Stunden begrenzt ist.<sup>197</sup>

Um herauszufinden, welchen Effekt der Transport der Zellen in das gynäkologische Labor auf das Zellüberleben hat, wurde eine Experimentreihe mit einer Transportkontrollgruppe durchgeführt. Da sich die Überlebensraten vor und nach dem Transport nicht signifikant voneinander unterschieden, konnte der Transport als potenzieller Faktor vernachlässigt werden. Dies spiegelte sich in einer hohen absoluten, relativen und adaptierten Überlebensrate der Transportkontrollgruppe wider. Auch bei der Beobachtung der Wiederfindungs- und Proliferationsrate konnte festgestellt werden, dass diese sich trotz des Transports auf einem stabilen Niveau hielten. Für jeden der genannten Parameter ließ sich beobachten, dass die Transportkontrollgruppe unter allen Gruppen die höchsten Durchschnittswerte aufwies. Dies waren die Gründe, warum der Transporteffekt nicht wie bei der Inkubation der Zellen mit Trypsin herausgerechnet wurde. Folglich kann bei der Interpretation der Ergebnisse der Gruppen C, D1, D2, und E davon ausgegangen werden, dass lediglich der Effekt der Kryokonservierung und nicht der Effekt des Transports analysiert wurde. Inwiefern sich die Ergebnisse der Transportkontrollgruppe auf kryokonservierte Gruppen übertragen lassen, bleibt weiterhin fraglich.

Der Vergleich der Gruppen A1 und A2 mit der Gruppe C zeigte, dass für diese drei Gruppen die generell höchsten absoluten Überlebensraten unter den kryokonservierten Gruppen beobachtet werden konnten. Dabei fiel auf, dass die Gruppen A1 und A2 zu beiden Zeitpunkten eine beobachtbar höhere absolute Überlebensrate aufwiesen als Zellen der Gruppe C. Zwar ließ sich ein solcher Trend erkennen, dieser wies jedoch keine statistische Signifikanz auf. Eine solche Tendenz hin zum etablierten Protokoll ließ sich auch bei Betrachtung der adaptierten Überlebensrate sowie der Proliferationsrate feststellen. Auffällig war, dass insbesondere die Wiederfindungsrate für alle drei Gruppen hoch zu sein schien. Bei der relativen Überlebensrate ließ sich in der Beobachtung der leichte Trend verzeichnen, dass die Gruppen A1 und A2 höhere Werte als die Gruppe C aufwiesen. Jedoch fielen die drei Gruppen nicht wie bei den anderen Parametern durch ihre vergleichsweise hohen Werte bei der relativen Überlebensrate auf.

Da sich die beiden Protokolle in mehreren Punkten unterschieden (siehe Tabelle 2), kann aufgrund des Experimentdesigns und der Methodik kein kausaler Faktor identifiziert werden, der die beobachteten Tendenzen erklärt. So wird das Zusammenspiel aus mehreren Faktoren

als mögliche Ursache angenommen, die einen solchen Trend erklären. Im Folgenden wird auf die Unterschiede der Protokolle eingegangen.

Die Bedeutsamkeit unterschiedlicher Kryomedien wurde bereits beschrieben (siehe 5.2). Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte bedacht werden, dass ein anderes Kryomedium für die Gruppe A1 verwendet wurde. Da die Zellen der Gruppe A1 jedoch nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden, wurde diese Gruppe im Vergleich der beiden Protokolle mitberücksichtigt.

Beim gynäkologischen Protokoll fand vor dem Einfrieren ein Sättigungsschritt statt, bei dem die Zellen mit Ethylenglykol und SSS inkubiert wurden. SSS diente der Supplementierung von Proteinen.

Das Hinzufügen von Proteinen wird für eine verbesserte Kryokonservierung von ovariellen Gewebe als bedeutsam betrachtet.<sup>137</sup> Da SSS aus humanem Serumalbumin besteht, existiert hier nicht das Risiko der Kreuzkontamination mit Fremdpathogenen.<sup>27,198</sup>

Es wurde jedoch argumentiert, dass FCS sich für ovariellen Gewebe besser als SSS eignet. Bei der Studie wurde das Proteinsupplement jedoch im Einfriermedium benutzt.<sup>137</sup> Im gynäkologischen Kryokonservierungsprotokoll wurde das Supplement in der Sättigungslösung verwendet. Inwiefern diese Erkenntnis auf hiPSCs-Aggregate bzw. auf Einzelzellen übertragbar ist, bleibt demnach fraglich.

Ein möglicher Mechanismus, der die beobachtete, niedrigere Überlebensrate der mit dem gynäkologischen Protokoll kryokonservierten Einzelzellen erklären könnte, wäre die Exposition der Zellen mit Ethylenglykol.

Genom-Mikroarrays konnten zeigen, dass Ethylenglykol zellulären Stress induzierte. So konnte erst 72h nach der Exposition der mit Ethylenglykol kryokonservierten Zellen eine partielle Erholung der Zellen festgestellt werden.<sup>199</sup> Dies würde für einen längerfristigen Effekt des penetrierenden Gefrierschutzmittels sprechen, was sich mit der weiter abnehmenden absoluten Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 decken würde. Des Weiteren wurde eine Konzentrationsabhängigkeit des toxischen Effekts des Ethylenglykols beschrieben.<sup>200</sup> Für limbale Stammzellen konnte bereits ab einer Überschreitung der Konzentration von 5% Ethylenglykol gezeigt werden, dass dies zu einer reduzierten Membranintegrität führte.<sup>201</sup> Dabei kann auch von einem zeitabhängigen Effekt der Toxizität ausgegangen werden. Dies konnte für Trehalose gezeigt werden, da sich bei geringerer Expositionszeit der Zellen mit dem Einfriermedium die Rate an Schwesterchromatiden-Austausch senkte.<sup>202</sup>

Folglich besteht die Hypothese, dass beim gynäkologischen Protokoll die Inkubation der hiPSCs mit Ethylenglykol zu lange mit einer zu hohen Konzentration erfolgte. Inwiefern die

Zentrifugation nach der Inkubation der Einzelzellsuspensionen die Konzentration des Ethylenglykols beeinflusste, bleibt fraglich. Wichtig zu ergänzen ist, dass beim Hinzufügen des Ethylenglykols bei der Einzelzellsuspension keine *dropping method* benutzt wurde.

Ein weiterer Unterschied bestand in der Zugabe von DMSO bei niedrigeren Temperaturen. Dadurch erhoffte man sich eine Reduktion der Toxizität des Gefrierschutzmittels.<sup>110</sup> Es stellte sich jedoch die Frage, ob so eine adäquate Inkubation der Zellen mit dem DMSO möglich war, da die Zellen bereits zuvor mit Ethylenglykol inkubiert worden waren. Aufgrund der niedrigeren Temperatur finden biochemische Prozesse langsamer statt<sup>203</sup>, sodass dies eine Erhöhung der Inkubationszeit mit DMSO erforderlich machen würde.

Ob die Konzentration der Zellen mit DMSO hoch genug war, ließ sich nicht beantworten. So bleibt unklar, ob sogar eine zu niedrige Konzentration an DMSO ein möglicher Mechanismus war, welcher unter anderem die erniedrigten Überlebensraten beim gynäkologischen Protokoll erklärt. Dies gilt jedoch auch für die hiPSCs-Aggregate, die nach dem etablierten Protokoll kryokonserviert wurden (Gruppe B1 und B2), da eine homogene Perfusion mit DMSO durch die komplexe Konformität als dreidimensionales Gewebe erschwert war. Eine ungleiche Perfusion komplexer Systeme wurde auch bei der Kryokonservierung epidermaler Zellen beschrieben.<sup>67</sup>

Inwiefern die meisten Kryokonservierungsprotokolle die Inkubation mit DMSO modifizieren sollten, stellte auch eine Studie 2020 in Frage. Es konnte gezeigt werden, dass eine 95%ige Äquilibration des intra- und extrazellulären Raums mit DMSO bereits nach ca. 35 Sekunden erreicht wurde und ein Auswaschen von DMSO schon nach ca. 49 Sekunden.<sup>204</sup> Inwiefern sich die Ergebnisse auf humanes Gewebe übertragen lassen, gilt es herauszufinden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Ersatz von DMSO mit Trehalose bei der Kryokonservierung von humanen, adulten Stamm- und Vorläuferzellen in geringen Überlebensraten mündete.<sup>65</sup> Dass bei der Kryokonservierung von hiPSCs auf DMSO sogar prinzipiell verzichtet werden kann, konnte 2011 illustriert werden.<sup>116</sup>

Ein wesentlicher Unterschied der beiden Protokolle bestand außerdem in den verschiedenen Kühlraten. Während beim langsamen Einfrieren die Dehydratation der Zelle und die allgemeine Zytotoxizität des Gefrierschutzmittels eine größere Rolle spielen, treten bei höheren Kühlraten eher Phänomene wie beispielsweise die Kristallisation von intrazellulärem Wasser auf.<sup>68,69,205</sup> Da beim etablierten Protokoll langsamere Kühlraten gewählt wurden, würde man bei alleiniger Betrachtung der Kühlrate annehmen, dass es hier eher zur Dehydrierung der Zelle und zum zytotoxischen Effekt des Gefrierschutzmittels kam. Dahingegen würde beim gynäkologischen Protokoll vermehrt die Kristallisation oder die Rekristallisation eine Rolle spielen. Dies muss jedoch beim gynäkologischen Protokoll nicht zwingend der Fall sein, da

der Sättigungsschritt das Zellüberleben ebenso beeinflussen könnte und es hierbei auch potenziell zu einer zu starken Dehydrierung und Zytotoxizität des Gefrierschutzmittels gekommen sein könnte.

Weiterhin bestehen Zweifel, ob das konventionelle Einfrieren überhaupt für multizelluläre Gewebe geeignet ist. So wurden in einer Studie niedrige Überlebensraten und eine geringe Expression des E-Cadherins bei 3D-Aggregaten, die mit langsamen Einfrierraten kryokonserviert wurden, festgestellt. In der Studie konnte eine Vitrifizierung eines 20mL großen Kryoröhrchens erreicht werden, welches ca.  $2 \times 10^7$  hiPSCs enthielt. Beim Aufwärmen wurden magnetische Nanopartikel verwendet. Limitierend ist jedoch, dass auch hier Zellzahlen von  $1 \times 10^9$  Zellen nicht erreicht wurden, welche für die Kryokonservierung ganzer Gewebe bzw. Organe notwendig sind.<sup>38</sup>

Generell sollte erwähnt werden, dass die optimale Kühlrate vom Zelltyp abhängig ist.<sup>69</sup> So hängen die optimale Kühlrate von der Permeabilität der Membran sowie dem Oberflächen-Volumen-Verhältnis ab<sup>66</sup>, weswegen für Stammzellen und Oozyten unterschiedlich optimale Kühlraten anzunehmen sind.

Ein weiterer Unterschied war, dass im gynäkologischen Protokoll automatisierte Einfriermaschinen benutzt wurden. Zwar konnte dadurch die Einfrierrate engmaschig kontrolliert werden, jedoch stellen eine geringe Verfügbarkeit sowie die hohen Kosten des Geräts Nachteile dar.<sup>27</sup>

In bereits einigen Studien konnte eine erfolgreiche Implementierung der automatisierten Einfriermaschinen dargestellt werden.

Bei der Kryokonservierung von adhärenenten iPSCs zeigte sich eine 6-fach erhöhte Genesung der Zellen, welche unter anderem auf die Implementierung von automatisierten Einfriermaschinen zurückgeführt wurde. Diese erlaubten einen dynamischen Wechsel der Einfrierraten.<sup>167</sup> Für dreidimensionale hESCs-Aggregate konnte eine signifikant erhöhte Erholungsrate der Zellen illustriert werden, wenn programmierbare Einfriermaschinen und nicht die konventionelle Methode, also langsames Einfrieren und schnelles Auftauen, verwendet wurden.<sup>121</sup> Da die Stammzellforschung zum Thema der programmierbaren Einfriermaschinen wie bereits beschrieben vielversprechende Ergebnisse aufwies, kann die Rolle der Einfriermaschinen debattiert werden. Ob die Implementierung der Einfriermaschinen einen Einfluss auf das Zellüberleben in diesem Experimentdesign hatte, konnte jedoch nicht genau beantwortet werden, da dies einer neuen Experimentreihe bedürfte. Es lässt sich jedoch die These aufstellen, dass das Einfrierprogramm auf ovarielles Gewebe angepasst war und andere, erforderliche Temperaturgrenzen für hiPSCs anzunehmen sind.

Überdies wurde im gynäkologischen Protokoll ein *Autoseeding* als Zwischenschritt durchgeführt, um so durch kontrollierte Initiierung von Eiskristallen eine schädliche und unbeherrschte Eisbildung zu minimieren.<sup>149</sup> Ohne das *Ice Seeding* käme es außerdem zur Nukleation der extrazellulären Eiskristalle im Bereich zwischen -20°C und -30°C beim Einfrieren. Durch *Ice Seeding* kann Energie freigesetzt werden, die bei der Rekristallisation beim Aufwärmen im Temperaturbereich zwischen -30°C und -5°C eine große Rolle spielt. Folglich käme es ohne das *Ice Seeding* zur Aggregation und zur Vergrößerung der Eiskristalle beim Aufwärmen, was eine Dehydratation der Zelle bewirken würde. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Mechanismus, der die verringerte Wahrscheinlichkeit der Rekristallisation erklärt, auf einer Reduktion der Entropie beim Abkühlen durch das *Ice Seeding* beruht.<sup>97</sup>

Ob und inwiefern die hiPSCs von einer initiierten Bildung von Eiskristallen profitieren, konnte durch das Experimentdesign abschließend nicht bewertet werden.

Eine erfolgreiche Kryokonservierung von hESCs-Fragmenten gelang 2006 mithilfe der Verwendung einer programmierbaren Einfriermaschine und eines Seedingsschritts bei -10°C. So konnten neun von elf Fragmenten den Kryokonservierungszyklus überleben und für eine längere Kultur genutzt werden.<sup>206</sup> Des Weiteren konnte illustriert werden, dass das *Ice Seeding* eine wichtige Komponente bei der Kryokonservierung von hESCs darstellt und das Überleben erhöhen konnte, wenn diese mit Glycerol und 1,2-Propandiol bei 1°C/min eingefroren werden.<sup>207</sup>

Da das *Ice Seeding* ohne den Gebrauch von penetrierenden Gefrierschutzmitteln zu einem Zellschaden führen kann, wurde eine Prädehydratation der Zelle mittels Trehalose empfohlen, um so das Volumen der Zelle zu minimieren. So konnte die freie Grenzflächenenergie vermindert werden, welche für den Prozess der Rekristallisation wichtig ist, da durch den Effekt der Trehalose weniger osmotisch wirksames Wasser zur Verfügung stand. Eine Kombination der Prädehydratation mit Trehalose und ein *Ice-Seeding*-Zwischenschritt konnten so das Zellüberleben von mehreren Zelltypen, darunter adulten Stammzellen und Fibroblasten, verbessern. Überdies wurde ein Plasmamembran-stabilisierender Effekt der Trehalose beschrieben. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Zellen bei dieser Studie verglast wurden.<sup>97</sup>

Es ließ sich nicht abschließend bewerten, ob die genannten Erkenntnisse auf langsamere Einfrierraten übertragen werden können.

Nichtsdestotrotz sollte erwähnt werden, dass das *Ice Seeding* auch zu einem osmotischen Schock führen kann, da die Bildung von Kristallen den osmotischen Gradienten erhöht.<sup>97</sup> Zwar scheint es, als würde eine Vielzahl von Zellen vom *Ice Seeding* profitieren. Jedoch lässt sich nicht abschließend bewerten, ob dies auch für hiPSCs bei Verwendung des gynäkologischen Protokolls der Fall war.

Auf die beiden unterschiedlichen Auftautemperaturen wird in einem separaten Kapitel eingegangen (siehe 5.7).

Ein weiterer Unterschied der beiden Protokolle war, dass im Rahmen des Auftauens beim gynäkologischen Protokoll eine Saccharose-haltige Auftauauflösung verwendet wurde.<sup>151</sup> Saccharose vermindert den osmotischen Schock, der auf die Zellen beim Auftauen wirken kann, und verhindert so eine zu starke Rehydrierung. Demnach konnte beobachtet werden, dass die Inkubation der Zellen mit Saccharose beim Auftauen ein übermäßiges Anschwellen reduziert.<sup>208</sup>

Interessanterweise konnte die Kryokonservierung von spermatogonialen Schweinestammzellen mit Saccharose zeigen, dass das Gefrierschutzmedium die Überlebensrate signifikant verbesserte. Dabei wurden antiapoptotische Effekte der Saccharose suggeriert, die insbesondere bei einer Konzentration von 210mmol/L hoch waren.<sup>209</sup>

Nichtsdestotrotz scheinen Disaccharide auch Nachteile mit sich zu bringen. Zum einen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Dehydrierung der Zellen im Rahmen des Auftauprozesses die hiPSCs schädigt. So würde eine zu starke Dehydrierung ein Schrumpfen der Zellen und folglich die Stabilität der Plasmamembran bewirken.<sup>67,69</sup>

Des Weiteren konnte für chinesische Hamsterzellen gezeigt werden, dass eine zu hohe extrazelluläre Konzentration an Trehalose durch den osmotischen Gradienten schädigend wirken kann. Zwar wurde in der Studie Trehalose im Rahmen des Einfrierprozesses und nicht beim Auftauen benutzt, jedoch konnte erneut der Effekt einer übermäßigen Dehydratation bei zu hoher Konzentration beobachtet werden.<sup>210</sup>

Für Zebrafisch-Oozyten konnte unter mehreren Gefrierschutzmitteln die höchste Toxizität bei der Saccharose festgestellt werden<sup>211</sup>. Eine andere Studie konnte zeigen, dass die kurzzeitige Inkubation von murinen Oozyten mit 0,5M Saccharose zu einem vernachlässigbaren Effekt bei der Fertilisation führte. Dahingegen verhinderte eine 20-minütige Inkubation der Oozyten mit 1,0M Saccharose die Fertilisation.<sup>212</sup>

Inwiefern die Effekte der Saccharose auf hiPSCs übertragbar waren, bleibt fraglich. Da die Studienlage zur Saccharose teilweise kontrovers schien und vom angewandten Zelltyp und Kryokonservierungsprotokoll abhing, erfordert dies eine höhere Anzahl an Studien zur kryobiologischen Stammzellforschung.

Ein negativer Aspekt, der sich anmerken ließ, war die Benutzung von Flüssigstickstoff zur Langzeitlagerung der kryokonservierten Zellen. Da dabei unter anderem das Risiko der Kreuzkontamination mit Fremdpathogenen besteht, sollte auf alternative Methoden zurückgegriffen werden.



Dazu eignet sich beispielsweise die -152°C Gefriertruhe. So kann auf ein Nachfüllen des Flüssigstickstoffs verzichtet und das Verletzungsrisiko minimiert werden.<sup>66</sup>

Generell sollte erwähnt werden, dass Stammzellen bei bereits geringer Schädigung eine hohe Vulnerabilität im Hinblick auf DNS-Schäden zeigten. Dahingegen wiesen adulte Stammzellen eine variablere Vulnerabilität auf.<sup>213</sup>

Eine erhöhte Vulnerabilität in Bezug auf zelluläre Dissoziation und Ablösung konnte bereits in einigen Studien für hESCs gezeigt werden.<sup>214,215</sup>

Eine hohe Vulnerabilität der hiPSCs gegenüber der Kryokonservierung wird teilweise auf die Notwendigkeit der interzellulären Signaltransduktion zurückgeführt, welche lediglich durch einen engen Kontakt der hiPSCs in Kolonien bestehen kann. Wie bereits erwähnt führt die Kryokonservierung in 3D-Aggregaten jedoch zu anderen Problemen, sodass dies ein Dilemma darstellt.<sup>27</sup>

Ovarielles Gewebe hat einen geringen Metabolismus und weist wenig kältesensible, intrazelluläre Lipide auf<sup>110</sup>, was die Wahrscheinlichkeit der Lipidperoxidation geringer macht. Da es sich bei Oozyten um bereits ausgereifte Zellen handelt, ist von einer geringeren Vulnerabilität auf Umweltschäden auszugehen.

Eine Studie aus dem Jahr 2017, bei der Fibroblasten und humane rote Blutzellen auf dieselbe Art kryokonserviert wurden, illustrierte, dass die Zellen eine unterschiedliche Vulnerabilität auf verschiedene Schritte der Kryokonservierung in Abhängigkeit von der Größe des osmotisch inaktiven Volumens zeigten<sup>97</sup>. Analog sollte dieses Beispiel zeigen, dass auch der unterschiedliche Aufbau von Oozyten und hiPSCs beim Vergleich der Ergebnisse bedacht werden sollte.

Da die *dropping method* bei der Rehydrierung mit E8 Medium lediglich bei 3D-Aggregaten stattfand, wird die Diskussion der *dropping method* im Kapitel 5.6 besprochen.

## **5.6. Kryokonservierung von dreidimensionalen Aggregaten nach dem etablierten Protokoll vs. nach dem gynäkologischen Protokoll**

Nachdem bereits der Unterschied der beiden Protokolle bei Einzelzellsuspensionen elaboriert wurde, folgt nun eine nähere Betrachtung der beiden Protokolle bei 3D-Aggregaten. Dazu wurden die Gruppen B1 und B2 jeweils mit den Gruppen D1 und D2 verglichen.

Bei Betrachtung der absoluten Überlebensraten konnte kein regelmäßiges Muster erkannt werden. Zu T1 konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die Gruppen B1 und B2 eine höhere relative Überlebensrate aufwiesen als die Gruppen D1 und D2. Besonders war, dass die Werte der relativen Überlebensraten für die vier Gruppen zu T1 auffällig hoch waren. Bei

der Wiederfindungsrate und der adaptierten Überlebensrate zeigten jedoch alle vier Gruppen niedrige Werte. Ebenso ließ sich hier keine konsistente Tendenz erkennen.

Lichtmikroskopisch präsentierten sich die dreidimensionalen Aggregate als Agglomerate, sodass genaue Zellbegrenzungen nicht erkannt werden konnten. Der Vergleich der Histogramme der Gruppen B1 und D1 zum Zeitpunkt T1 illustrierte eine leichte Linksverschiebung der Durchmesser der lebendigen Zellen aus der Gruppe D1, was für eine leichte Vergrößerung des Durchmessers der Zellen der Gruppe B1 sprach. Auch für tote Zellen konnte rechnerisch ein erhöhter Durchmesser der Zellen der Gruppe B1 ermittelt werden. Zum Zeitpunkt T2 konnte eine solche Linksverschiebung optisch auch für tote Zellen der Gruppe D1 beobachtet werden. Interessanterweise fiel eine generell hohe Streubreite der Durchmesser der lebendigen Zellen der Gruppe B1 und D1 zum Zeitpunkt T2 auf. So ließ sich postulieren, dass einzelne, verschieden große Agglomerate überlebten, was für ein ungleichmäßiges Wachstum unterschiedlich großer Zellen spricht.

Inwiefern ein Sättigungsschritt, die unterschiedlichen Kühlraten und die Benutzung von automatisierten Maschinen eine Rolle spielen können, wurde im Kapitel 5.5 bereits erwähnt.

Zu den Kühlraten lässt sich zusätzlich erwähnen, dass ovarielles Gewebe nach der Vitrifizierung sogar eine Rate von 86% normal entwickelten Follikeln aufwies. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass ovarielles Gewebe sogar als komplexeres System sehr hohe Kühlraten tolerierten.<sup>216</sup> Nichtsdestotrotz sollte angemerkt werden, dass bis zum Jahr 2019 lediglich zwei Lebendgeburten registriert wurden, bei denen zuvor vitrifiziertes, ovarielles Gewebe zum Einsatz kam.<sup>135</sup>

Beim gynäkologischen Protokoll wurden höhere Einfrierraten als beim etablierten Protokoll benutzt, da die Zellen ab  $-34^{\circ}\text{C}$  in Flüssigstickstoff getaucht wurden. Solch hohe Überlebensraten wie bei der Vitrifizierung vom ovariellen Gewebe<sup>216</sup> oder bei der Kryokonservierung mit einem Protokoll, bei dem das Gewebe ab  $-34^{\circ}\text{C}$  in Flüssigstickstoff getaucht wurde, ließen sich für dreidimensionale hiPSCs-Aggregate in dieser Experimentreihe nicht feststellen. Demnach sollte bei der Kryokonservierung hinterfragt werden, ob hiPSCs-Aggregate derart hohe Kühlraten tolerieren und ob Erkenntnisse aus der Reproduktionsmedizin auf die Stammzellforschung genau übertragbar sind.

Zwar schaffte man beispielsweise in einer Studie aus dem Jahr 2020 hiPSCs-Aggregate zu vitrifizieren, jedoch wurden beim Auftauen Magnetpartikel nanoerwärmt.<sup>38</sup>

Da in dieser Experimentreihe das konvektive Auftauverfahren benutzt wurde und die hiPSCs-Aggregate zuvor nicht klassisch vitrifiziert wurden, ist der Vergleich komplex. Ob die niedrige absolute Überlebensrate der 3D-Aggregate in diesen Experimenten auf die Kühlraten, das konventionelle Erwärmen oder andere Faktoren zurückzuführen war, bleibt unklar.

Nichtsdestotrotz zeigte die Studie aus 2020, dass hiPSCs-Aggregate mit Überlebensraten von rund 75% prinzipiell in der Lage sind, hohe Kühlraten zu überleben.<sup>38</sup> Demnach stellt eine Kombination aus Verglasung und Nanoerwärmung ein vielversprechendes Verfahren zur Kryokonservierung von hiPSCs-Aggregaten dar.

Generell betrachtet gibt es bisher wenige Studien, in denen hiPSCs Aggregate mit höheren Kühlraten erfolgreich skalierbar kryokonserviert wurden.

Bei der Zugabe von DMSO bei niedrigeren Temperaturen lässt sich für 3D-Aggregate zusätzlich erwähnen, dass eine Perfusion der Zellen im Inneren mit DMSO mehr Zeit in Anspruch nimmt. Während äußere Zellen durch den Kontakt zum Einfriermedium mit DMSO perfundiert werden, ist dies für Zellen im Inneren nicht gewährleistet.<sup>38,67</sup> Dies konnte durch das Anfärben der Zellen mit Calcein AM bestätigt werden. Hier zeigte sich die Grünfärbung im Randbereich schwach, während die Zellen im Inneren eine starke Anfärbung aufwiesen (siehe Abbildung 25, (B)). Inwiefern eine ausreichende Perfusion der inneren Zellen mit DMSO gewährleistet wurde, lässt sich abschließend nicht beurteilen. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass die inneren Zellen in einem zu geringen Ausmaß mit Gefrierschutzmitteln inkubiert wurden.

Zusätzlich sollte an dieser Stelle zum *Autoseeding* erwähnt werden, dass eine gewisse Konzentration an penetrierenden Gefrierschutzmitteln notwendig ist, um den osmotischen Schock, der beim Einfrieren entstehen kann, sowie die intrazelluläre Bildung von Eis zu reduzieren.<sup>97</sup> Inwiefern dies hier beim gynäkologischen Protokoll gewährleistet wurde, ist fraglich. Es lässt sich zusätzlich die Frage aufwerfen, ob hiPSCs-Aggregate in der Permeabilität der Gefrierschutzmedien intrinsische Unterschiede zu ovariellm Gewebe aufweisen.

Da bei den Gruppen D1 und D2 die *dropping method* verwendet wurde, sollte auch diese Methodik diskutiert werden. Ein Vorteil dieser Methode stellt ein schrittweises Heranführen der Zellen an die veränderten osmotischen Verhältnisse dar.<sup>110</sup> So konnte für eine schrittweise Rehydrierung der Oozyten gezeigt werden, dass eine direkte Rehydrierung Zellorganellen sowie die zytoplasmatische und die pronukleäre Membran schädigte, da es hierbei zu einer zu schnellen Veränderung der osmotischen Bedingungen kam.<sup>153</sup> Auch beim etablierten Protokoll wurden die hiPSCs schrittweise mit E8 Medium resuspendiert, jedoch erfolgt dies schneller.

Ein Nachteil der *dropping method* ist, dass die Inkubationszeit der hiPSCs mit der jeweiligen Lösung länger ist. Während dieser Aspekt im Rahmen der Rehydrierung mit E8 Medium vermutlich keinen hohen Stellenwert hat, kann dies bei der Inkubation mit Ethylenglykol oder Saccharose anders sein. So konnte in anderen Studien bereits dargestellt werden, dass die

Toxizität der Gefrierschutzmittel sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig ist.<sup>200,202</sup> Doch auch die Temperatur, bei der das Gefrierschutzadditiv zu den Zellen hinzugegeben wird, kann das Zellüberleben beeinflussen.<sup>65</sup> Demnach liegt die Vermutung nahe, dass ein Teil der Senkung der Überlebensraten auf eine zu lange Expositionsdauer des Ethylenglykols und der Saccharose mit den hiPSCs hinweist. Die *dropping method* stellte ein Beispiel für das Dilemma bei der Kryokonservierung dar. Während das schrittweise Heranführen an veränderte osmotische Gegebenheiten für das Zellüberleben wichtig ist, kann auch eine nicht zu lange Inkubation der Zellen mit den Gefrierschutzmitteln als essenziell betrachtet werden.<sup>67</sup>

Außerdem sollte erwähnt werden, dass die *dropping method* zeitaufwändiger ist. Folglich verlängert eine zusätzliche Inkubation mit dem Auftaumedium in Kombination mit der *dropping method* den Auftauprozess, sodass es mehr Zeit in Anspruch nimmt, bis die Zellen bei 37°C inkubiert werden können. Eine längere Inkubation der Zellen mit Gefrierschutzmitteln könnte somit als Ursache für eine Erniedrigung der Zellüberlebensrate aufgeführt werden.

Wie im Kapitel 5.5 bereits illustriert, konnte kein einzelner Mechanismus genannt werden, welcher die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Protokollen erklären könnte. Vielmehr scheint die Gesamtheit der Unterschiede der beiden Protokolle zu den genannten Veränderungen in den Überlebensraten geführt zu haben. Es zeigte sich insgesamt, dass das bereits etablierte Protokoll besser für die Kryokonservierung von Einzelzellen geeignet zu sein schien, da hier klarere Tendenzen beobachtet werden konnten. Bei 3D-Aggregaten ist die Bewertung, ob das etablierte oder gynäkologische Protokoll zur Kryokonservierung geeigneter war, komplexer. Dies liegt zum einen daran, dass die Dissoziation der Zellen die Überlebensraten verfälschen könnte. Insgesamt konnte jedoch die Tendenz beobachtet werden, dass die hiPSCs-Aggregate höhere absolute Überlebensraten beim etablierten Protokoll aufwiesen. Es sollte erwähnt werden, dass die absoluten Überlebensraten der hiPSCs-Aggregate in einem niedrigen Bereich lagen, sodass Tendenzen zwar erkennbar waren, jedoch auch beim etablierten Protokoll mit dem gynäkologischen Einfriermedium Optimierungsbedarf besteht.

Demnach bedürfte es hier mehr Studien, welche die einzelnen Unterschiede genauer aufarbeiten. So könnte wie beim Einfriermedium (Gruppe A1 vs. A2) untersucht werden, ob die hiPSCs von den einzelnen Schritten und Modifikationen des gynäkologischen Protokolls bei der Kryokonservierung profitieren würden.

## **5.7. Auftauen der Zellen bei 37°C vs. bei 100°C**

Möchte man die verschiedenen Auftautemperaturen miteinander vergleichen, so bietet es sich an, die Gruppe D1 mit der Gruppe E zu vergleichen. Dies liegt daran, dass sich beide Gruppen

lediglich im Parameter der Auftautemperaturen unterschieden. Diese betrug für die Gruppe D1 37°C und für die Gruppe E 100°C.

Auffällig war, dass Gruppe E unter allen Gruppen die beobachtbar niedrigste, absolute Überlebensrate zu beiden Zeitpunkten nach der Kryokonservierung aufwies. Es konnte observiert werden, dass die absolute Überlebensrate der Zellen nach 24-stündiger Inkubation weiter sank. Die relative Überlebensrate hielt sich für die Gruppe E über beide Zeitpunkte auf einem relativ konstanten Niveau.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Wiederfindungsrate in der Gruppe E im Vergleich zu allen anderen Gruppen am niedrigsten war. Die generell geringe Zellausbeute der Gruppe E kann erklären, warum sich die Proliferationsrate auf einem mittelhohen Niveau befand. Die sehr geringe Anzahl an überlebenden und wiedergefundenen Zellen verzerrte die Proliferationsrate. So darf die Proliferationsrate der Gruppe E nicht als Anlass für die Schlussfolgerung genommen werden, dass Auftautemperaturen von 100°C für hiPSCs geeignet seien. Da die Zellausbeute der Gruppe E auf einem niedrigen Niveau war, ist die Anzahl an Zellen, die zum Zeitpunkt T2 potenziell zusätzlich untergehen oder nicht-wiedergefunden werden können, generell geringer. Des Weiteren lässt sich mit der niedrigen Wiederfindungsrate ebenfalls begründen, warum für die adaptierte Überlebensrate der Gruppe E ein niedrigerer Wert als für die relative Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 beobachtet wurde. Aufgrund der Tatsache, dass die Wiederfindungsrate nicht-wiedergefundene Zellen als tot bewertet, wird die relative Überlebensrate in noch niedrigere Prozentbereiche korrigiert. Weil die Anzahl an wiedergefundenen Zellen derart gering war, sollte die relative Überlebensrate vorsichtig interpretiert werden. Zwar fällt die Gruppe E bei Betrachtung der relativen Überlebensrate nicht auf, jedoch zeigt die Beobachtung einer niedrigen absoluten Überlebens- und Wiederfindungsrate, dass sich Auftautemperaturen von 100°C für hiPSCs nicht eignen.

Wurde der Vergleich zur Gruppe D1 gezogen, so fiel auf, dass die absolute und relative Überlebensrate der Gruppe D1 zu beiden Zeitpunkten beobachtbar höher waren als jene der Gruppe E. Erwähnenswert ist, dass sich die absolute Überlebensrate für beide Gruppen jedoch in einem niedrigen prozentualen Bereich befand. Auch für die Gruppe D1 ließ sich beobachten, dass diese zum Zeitpunkt T1 eine höhere absolute und relative Überlebensrate als zum Zeitpunkt T2 aufwies. Dies konnte durch Betrachtung der niedrigen Proliferationsrate bestätigt werden. Für die Wiederfindungsrate ließen sich zu beiden Zeitpunkten ebenso höhere Werte für die Gruppe D1 als für die Gruppe E observieren. Auffällig dagegen ist, dass die adaptierte Überlebensrate der Gruppe E höher war als jene der Gruppe D1. Dies ergibt sich einerseits aus der Berechnung der adaptierten Überlebensrate und andererseits aus der niedrigen Wiederfindungsrate der Gruppe E. Die adaptierte Überlebensrate wurde zum

Zeitpunkt T2 berechnet und bezieht lediglich die Differenz der nicht-wiedergefundenen Zellen zum Zeitpunkt T1 und nicht zu T0 ein. Demnach sollte eine solch beobachtbare Erhöhung der adaptierten Überlebensrate mit Vorsicht interpretiert werden.

Der Versuch, die hiPSCs bei 100°C aufzutauen, basierte auf der Annahme, dass durch eine zu geringe Auftautemperatur die Expositionszeit der Zellen mit dem Gefrierschutzmittel steigt, was den potenziell toxischen Effekt auf die Zellen erhöht. Überdies erhöht eine zu geringe Auftaurate die Auftretenswahrscheinlichkeit der Rekristallisation.<sup>217,218</sup>

In reproduktionsmedizinischen Studien konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine zu hohe Auftaurate einen zu starken Efflux des Glycerins und eine zu starke Osmose des Wassers nach intrazellulär bewirken kann.<sup>78</sup> Um den osmotischen Schock der Zellen beim Auftauen zu reduzieren, wird eine schrittweise Resuspension der Zellen mit dem Kulturmedium empfohlen.<sup>218</sup> Dies wurde jedoch in den Gruppen D1 und E bereits berücksichtigt.

Welche Folgen eine zu hohe Auftautemperatur auf makroskopischer Ebene haben kann, zeigte das Beispiel von kryokonservierten, iliakalen, arteriellen Segmenten von Minischweinen. Bei einer zu hohen Auftautemperatur konnten eine erhöhte Rate an spontanen Mikrofrakturen sowie eine Ansammlung von Flüssigkeiten in der Subelastika gezeigt werden, was in einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit von spontanen Brüchen des Gefäßes resultierte.<sup>219</sup>

Auf mikroskopischer Ebene zeigte sich, dass bei erhöhten Temperaturen Hitzeschockproteine, zum Beispiel das HSF1, freigesetzt werden, um die Transkription von Chaperonen zu stimulieren.<sup>220</sup> Dabei konnte illustriert werden, dass HSF1 die Expression von Oct4 negativ reguliert.<sup>221</sup>

In einer anderen Studie von 2019 konnte dargestellt werden, dass bei gleichbleibender Auftaurate die Überlebensrate von T-Zellen variierte, je nachdem, welche Einfrierrate zuvor gewählt wurde. Auch wurde gezeigt, dass unterschiedliche Zelltypen anders auf dieselben Temperaturkonstellationen reagierten.<sup>222</sup> Die Annahme, dass Daten aus der Reproduktionsmedizin auf somatische Zellen übersetzt werden können, scheint somit zu stark simplifiziert. So herrscht für jeden Zelltyp ein Optimum, welches bei der Wahl der Einfrier- und Auftaurate berücksichtigt werden muss. Der Einfluss der Auftautemperatur kann durch den Vergleich der Gruppen D1 und E ebenso bestätigt werden.

Vitrifizierte Oozyten können hohe Auftauraten von bis zu 20000°C/min überleben.<sup>217</sup> Dies scheint für hiPSCs nicht der Fall zu sein. So zeigt das Beispiel der Allografts mit Zement im Rahmen von Hüftoperationen, dass bei Zugabe von mesenchymalen Stammzellen die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf das Zellüberleben haben kann. Es konnte

dargestellt werden, dass die Zellen eine Temperatur von 48°C für 150 Sekunden tolerierten, wobei eine Erhöhung der Temperatur um 10°C in einem Absterben der Zellen resultierte. Da die mesenchymalen Stammzellen einen Einfluss auf die Neubildung von Knochen und den Reperationseffekt von Defekten haben können, kann dies erhebliche Folgen für den klinischen Alltag haben.<sup>156</sup>

Eine mögliche Ursache für das Absterben der Zellen kann die Denaturierung von Enzymen bei zu hohen Temperaturen sein. Dabei kommt es unter anderem zur Desamidierung der Aminosäuren Glutamin und Asparagin sowie zur Bildung von Succinamid bei Glutamat und Aspartat. Die Folge ist eine Hydrolyse der Peptidbindungen.<sup>223</sup> Des Weiteren kann es zur Aggregation an hydrophoben Stellen von Enzymen kommen, sodass diese der Denaturierung ausgesetzt sind.<sup>224</sup>

Inwiefern das Dilemma der Auftautemperatur zum Teil gelöst werden kann, zeigen neue Ansätze. So erlaubt beispielsweise die induktive Nano-Erwärmung von magnetischen Partikeln eine schnelle und homogene Erwärmung von Proben mit hohen Volumina über 20mL. Durch Nano-Erwärmung gelang es den Wissenschaftlern die Zellviabilität von hiPSCs, welche als Einzelzellsuspension in einem Volumen von 8-20mL vorlagen, nach dem Auftauen zu erhöhen. Nach einer darauffolgenden Kultivierung zeigte sich, dass die Zellen Kolonien formierten und alkalische Phosphatase exprimierten. Bei der Differenzierung der Zellen wurden ebenso, je nach Keimblatt, linienspezifische Gene exprimiert. Überdies konnten hiPSCs Aggregate aus einem Bioreaktor-basierten Ansatz mit einer hohen Viabilität aufgetaut werden. Diese exprimierten nach dem Auftauen den Pluripotenzmarker Oct3/4. Man stellte außerdem fest, dass vitrifizierte hiPSCs, welche anschließend mit induzierter Nano-Erwärmung behandelt wurden, eine erhöhte Überlebensrate und höhere Expressionsraten an E-Cadherin aufwiesen als jene, welche mit langsamen Einfrierraten kryokonserviert wurden. Zu erwähnen ist jedoch, dass eine transiente Akkumulation der Nanopartikel in der Leber von Mäusen festgestellt werden konnte. Eine vollständige Elimination konnte erst nach 10 Tagen festgestellt werden. So sollte der systemische Effekt der magnetischen Partikel auf eine *in vivo* Differenzierung noch weiter analysiert werden.<sup>38</sup>

Demnach illustrieren die oben genannten Studien und Beispiele, dass zum einen die gewählte Methode des Auftauens reevaluiert werden sollte. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass ein komplexes Zusammenspiel aus der Einfrier- und Auftaurate besteht, sodass es der Identifikation kritischer Temperaturen bedarf, welche im Rahmen der Kryokonservierung nicht unter- und überschritten werden dürfen.

### 5.8. Kryokonservierung von Sphäroiden (*embryoid bodies*)

Zur späteren Beladung von Bioreaktoren wurden EBs generiert. Es ließ sich bereits vor der Kryokonservierung beobachten, dass die Basis Überlebensrate der Gruppe S niedriger war als die der anderen Gruppen. Diese Abweichung sollte jedoch vorsichtig interpretiert werden, da die Zellsphäroide zur Analyse mit Trypsin inkubiert wurden. Da bei der Trypsinkontrollgruppe lediglich 3D-Aggregate benutzt wurden, konnte die Basis Überlebensrate nicht wie bei den anderen trypsinisierten Gruppen hochkorrigiert werden. Es ist somit davon auszugehen, dass auch die *embryoid bodies* eine hohe Basis Überlebensrate aufwiesen.

Bei Betrachtung der absoluten Überlebensrate fiel auf, dass die Gruppe S, wie alle anderen kryokonservierten Gruppen, zum Zeitpunkt T2 eine niedrigere absolute Überlebensrate aufwies als zu T1. Dies spiegelte sich in der negativen Proliferationsrate wider. Auffällig war jedoch, dass für die Proliferationsrate der Gruppe S im Vergleich zu anderen Gruppen ein relativ hoher Wert beobachtet wurde. Dies stimmte mit der Beobachtung überein, dass die relative Überlebensrate zwischen T1 und T2 auf einem konstanten Niveau blieb, während die Wiederfindungsrate sank. Eine Abnahme der Wiederfindungsrate konnte die erniedrigte absolute Überlebensrate zum Zeitpunkt T2 teilweise erklären. Die adaptierte Überlebensrate hingegen wies ein mittelhohes Niveau auf. Generell sollte erwähnt werden, dass die enzymatische Dissoziation der Zellsphäroide die absolute Überlebensrate vermutlich analog zu den Gruppen B2 und D2 erniedrigte. So kann davon ausgegangen werden, dass durch alleinige Kryokonservierung ohne die Inkubation mit Trypsin die absolute Überlebensrate in einem höheren Bereich läge.

Wurde das Kriterium der Morphologie hinzugezogen, so fiel auf, dass die Erniedrigung der absoluten Überlebensrate sich in dem lichtmikroskopischen Bild nach der Kryokonservierung widerspiegelte (siehe Abbildung 27, (B) und (C)). Dieses ließ sich durch eine Abnahme der Dichte an Sphäroiden pro Gesichtsfeld, an der Vielzahl an kleinen Zelltrümmern sowie an einer inhomogenen Morphologie kennzeichnen.

Dass sich ein potenziell verzögerter Effekt der Kryokonservierung auf den Durchmesser der Zellsphäroide vermuten lässt, äußerte sich durch die Tatsache, dass lediglich die paarweisen Vergleiche zwischen T0 und T2 sowie zwischen T1 und T2 bei der Analyse der Sphäroiddurchmesser signifikant waren. Ein möglicher Ansatz stellt die Tatsache dar, dass die Deregulation jener Gene, die in Signalwegen des Zelltods involviert sind, erst 6h nach der Kryokonservierung und der erneuten Zellkultur ihren Höhepunkt erreicht.<sup>30</sup> An dieser Stelle sollte erneut erwähnt werden, dass die Zunahme des Durchmessers zum Zeitpunkt T2 auf eine Proliferation der gesunden Zellen hinweisen könnte. Da die Begrenzung der Zelltrümmer unscharf war, konnte der Durchmesser der toten EBs nicht genau bestimmt werden. Demnach



sollte bei der Interpretation der Durchmesser der Zellsphäroide bedacht werden, dass der Durchmesser lediglich jener Sphäroide bestimmt wurde, die eine intakte und scharfe Begrenzung aufwiesen.

So zeigen die Ergebnisse zusammenfassend, dass EBs für die Kryokonservierung mit dem etablierten Protokoll zwar geeignet sind, das verwendete Protokoll jedoch vielmehr auf die Kryokonservierung von hiPSCs angepasst zu sein scheint. Dies spiegelte sich in der beobachtbar erhöhten absoluten Überlebensrate der Gruppe A1 oder A2 wider. Da es sich bei den EBs auch um dreidimensionale Strukturen handelt, liegt die Vermutung sehr nahe, dass die Ursachen für die Erniedrigung der Überlebensraten denselben Mechanismen entsprechen, die bereits in den Kapiteln 5.4 und 5.5 erläutert wurden.

Auch andere Studien beschäftigten sich bereits mit der Kryokonservierung von EBs.

Bei der Kryokonservierung muriner EBs konnte dargestellt werden, dass die höchste Überlebensadhäsion jene EBs hatten, die mit einer programmierbaren Maschine eingefroren wurden. Wurden die EBs mit einem BiCell®, einer Polypropylenplatte, eingefroren, so lagen die Überlebensraten zwischen 30 und 38%.<sup>225</sup> Diese Überlebenszahlen decken sich mit den Überlebensraten, die durch das bereits etablierte Protokoll hier erreicht wurden. Ursächlich für eine Erniedrigung der Überlebensraten könnte die Anoikis sein, bei der es durch den fehlenden Zell-Zell-Kontakt und die Ablösung der Zellen zu einer speziellen Form der Apoptose kommt.<sup>226</sup> Des Weiteren erhöht sich nach der Kryokonservierung im Rahmen der Hyperthermie die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies. Zudem kommt es zu einer Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-9.<sup>227</sup>

Für intakte *embryoid bodies* konnte gezeigt werden, dass diese eine geringere Expression an reaktiven Sauerstoffspezies und eine erhöhte Überlebensrate aufwiesen als dissoziierte EBs. Dies wurde auf die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte, der extrazellulären Matrix und des F-Aktin Zytoskeletts zurückgeführt, was die Zellen vor oxidativem Stress schützt. Demnach konnte gezeigt werden, dass die Mikroumgebung eine wichtige Rolle bei der Kryokonservierung von EBs spielt. Des Weiteren sollte nicht unerwähnt bleiben, dass das Hinzufügen des ROCK-Inhibitors zu den dissoziierten EBs die Genesung nicht signifikant verbessern konnte.<sup>228</sup> Dieses Beispiel zeigt, dass die Erkenntnisse der hiPSCs nicht direkt auf EBs übertragen werden können.

Es sollte erwähnt werden, dass bereits 2005 dargestellt werden konnte, dass das Hinzufügen von Ethylenglykol zum DMSO- und FBS-haltigen Einfriermedium das Zellüberleben signifikant verbessern konnte.<sup>185</sup> Demnach liegt die Vermutung nahe, dass auch EBs von dem Einfriermedium aus der Gynäkologie profitieren.

Da die Gruppe A2 in der Beobachtung unter den kryokonservierten Gruppen die höchste absolute Überlebensrate über beide Zeitpunkte hinweg aufwies, wurde sich für ein Verfahren der Kryokonservierung von Zellsphäroiden entschieden, das dem der Gruppe A2 ähnlich war. Ob sich die Erkenntnisse der Gruppen A1 bis E auf die Zellsphäroide übertragen lassen, bleibt nicht abschließend geklärt.

In einer Studie konnte jedoch auch berichtet werden, dass die Membranintegrität der Zellsphäroide bei einer hohen Kühlrate von  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , unabhängig von der gewählten Trehalose Konzentration, ein ähnlich hohes Niveau aufwies wie nicht-kryokonservierte EBs. Dahingegen waren die Adhäsionsrate und das Zellwachstum bei einer Kühlrate von  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  mit einem Einfriermedium, das aus 5% DMSO und 0,1M Trehalose bestand, besser. Folglich scheinen EBs eine geringe Vulnerabilität gegenüber der Kühlrate aufzuweisen.<sup>229</sup> Die Studie zeigt zum einen, dass nicht nur die Membranintegrität als Parameter herangezogen werden sollte. Zum anderen betont dieses Beispiel die Vielschichtigkeit des Problems bei der Kryokonservierung. Je nach zu adressierendem Parameter ändert sich die subjektive Bewertung des optimalen Protokolls.

Zu erwähnen ist überdies, dass der positive Effekt durch das Hinzufügen von Trehalose zum Einfriermedium bei *embryoid bodies* weniger evident war. Eine Hypothese besagt, dass dies auf die Struktur der Zellsphäroide zurückgeführt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Zuckerketten in den Glykoproteinen und Proteoglykanen einen kryoprotektiven Effekt aufweisen, könnte dies beim Hinzufügen von Trehalose einen solchen Effekt weniger deutlich machen. Überdies stellt sich die Frage, ob die zuckerhaltigen Makromoleküle aus der extrazellulären Matrix bereits früher verglasen als der Rest der Suspension, sodass eine solche Glasschicht eine Schutzfunktion für die Zelle bieten würde.<sup>229</sup>

Die Kryokonservierung von Suspensionskulturen in Bioreaktoren bietet Vor- und Nachteile. Ein Vorteil ist, dass eine kontrollierbarere Mikroumgebung der Zellen generiert wird, welche eine homogenere Perfusion erlaubt. Des Weiteren kann durch Bioreaktoren eine hohe Zellzahl generiert werden, was für ein skalierbares Kryokonservierungsprotokoll unabdingbar ist. Nachteil der Methode ist jedoch, dass eine Suspensionskultur von embryonalen Stammzellen durch eine Agglomeration der Zellen behindert wird.<sup>115</sup>

Dies kann jedoch durch das Verkapseln von ESCs in Agarose verbessert werden, was eine E-Cadherin Expression verhindert.<sup>230</sup> Ein genereller Nachteil bei der Zellkultur mit Sphäroiden ist außerdem, dass aufgrund der Größe eine homogene Diffusion der Zellen mit Nährstoffen als schwierig zu bewerten ist. Des Weiteren kommt es durch die 3D-Konformation zu einer beschleunigten Akkumulation von metabolischen Abbauprodukten.<sup>231</sup>

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass nicht nur die Kryokonservierung, sondern auch die eigentliche Suspensionsbioreaktor-Differenzierung im skalierbaren Ausmaß Probleme

bereitet. Dazu zählen eine verminderte Reproduzierbarkeit, beispielsweise durch eine inhomogene Größe der EBs, sowie ein hoher Arbeitsaufwand und hohe Kosten.<sup>49,232</sup>

Erste Erfolge konnten jedoch bereits verzeichnet werden. So schaffte man es, ein Protokoll zur Generierung von hiPSC-CMs in einer skalierbaren 3D Suspensions-Bioreaktorkultur zu erstellen, welches eine höhere Unabhängigkeit der Zellaussaatdichte aufwies. Dies führte zu einer verringerten Variabilität bei der Generierung von hiPSC-CMs.<sup>49</sup>

Die genannten Hypothesen sowie die generell auffallend geringe Anzahl an Studien, in denen humane EBs kryokonserviert wurden, sind Indikatoren dafür, dass es weiterer Studien bedarf, die sich mit der systematischen Optimierung der Kryokonservierung von humanen *embryoid bodies* beschäftigen. Inwiefern die Zellsphäroide von der Kryokonservierungsmethode für ovarielles Gewebe profitieren, bleibt jedoch fraglich.

## 5.9. Limitationen

Einige Limitationen wurden bereits im Diskussionsteil, wo thematisch passend, erwähnt.

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße ( $n=3$ ) mussten zur statistischen Auswertung der Überlebensraten sowie der Proliferationsrate non-parametrische Verfahren angewendet werden. Diese weisen jedoch bei normalverteilten Datensätzen eine geringere Teststärke als parametrische Verfahren auf<sup>233</sup>, sodass unter Umständen bei manchen Auswertungen kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden konnte, obwohl in der Realität einer besteht. Um dieses Problem zu lösen, hätte die Stichprobengröße vergrößert werden müssen. Tendenzen waren oftmals zu sehen und eine Messpunkt-wiederholung lag vor, sodass die Vermutung naheliegt, dass bei einer Erhöhung der Stichprobengröße einige Rückschlüsse statistisch fundierter hätten belegt werden können. Aufgrund der oben genannten Problematik und der Tatsache, dass unter der Studienlage zu gewissen kryobiologischen Sachverhalten ein Konsens herrscht, wurde als Basis des Diskussionsteils für diese Doktorarbeit oftmals eine deskriptive Statistik genommen, obwohl inferenzstatistisch kein signifikanter Unterschied gefunden wurde.

Ein weiterer Schwachpunkt der Methoden stellte die Tatsache dar, dass die beobachteten Parameter nicht über einen Zeitraum von länger als 24 Stunden analysiert wurden. So stellte sich die Frage, in welchem Zeitraum sich die Zellen von der Kryokonservierung erholen. Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass sich die Zellen fünf Tage nach dem Auftauen phänotypisch von der Kryokonservierung erholt haben, wobei die Anzahl an Kolonien im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer war.<sup>30</sup>

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine andere Studie, bei der man ebenso ein ungleichmäßiges Wachstum von hESCs nach der Kryokonservierung feststellte. Erst nach 4-

6 Tagen konnte ein stabiler Zustand erreicht werden. Dies wurde unter anderem auf die Dissoziation von äußeren Zellen im Aggregat zurückgeführt.<sup>115</sup>

Generell kann als Limitation vieler Studien aufgeführt werden, dass kein einheitlich definierter Zeitpunkt aufgeführt wird, zu dem die kryokonservierten Zellen analysiert werden. Dies erschwerete die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Kryokonservierungsprotokolle. Dies kann ebenso auf die Methoden zur Determinierung der Überlebensraten sowie die Berechnung der Überlebensraten ausgeweitet werden, da diese ebenso je nach Studie variieren.<sup>27</sup>

Ein methodischer Aspekt dieser Arbeit betrifft die Durchführung der Post-hoc-Analysen. Aufgrund der Vielzahl an Gruppen, der begrenzten Fallzahlen ( $n=3$ ) und der primär explorativen Zielsetzung wurde bei den paarweisen Vergleichen nach einem Kruskal-Wallis-Test auf eine konservative Korrektur für multiples Testen, beispielsweise nach Bonferroni, verzichtet. Stattdessen wurden  $p$ -Werte im Rahmen einer explorativen Analyse interpretiert. Zur Reduktion des  $\alpha$ -Fehlers bei mehrfachen Tests auf zwei Zeitpunkten wurde jedoch eine Anpassung des Signifikanzniveaus auf  $p < 0,025$  vorgenommen. Eine weitergehende Adjustierung über alle Vergleiche hinweg wurde nicht vorgenommen, um das Risiko eines Fehlers 2. Art zu minimieren und so potenziell relevante Effekte nicht zu übersehen.<sup>161,162,234</sup>

In zukünftigen Studien mit größeren Fallzahlen wäre eine umfassendere Korrektur, beispielsweise mittels Holm-Bonferroni oder False-Discovery-Rate, zu erwägen.<sup>235</sup> Ebenso ist anzustreben, dass die dargestellten, potenziellen Einflussfaktoren auf die Kryokonservierung in Studien mit größeren Fallzahlen überprüft und repliziert werden.

Die vorliegende Arbeit kombiniert sowohl a-priori formulierte Hypothesen als auch hypothesengenerierende Ansätze. Ursprünglich verfolgte die Studie das Ziel, ein Kryokonservierungsprotokoll aus der gynäkologischen Klinik auf hiPSCs zu übertragen. Zu diesem Zweck wurden teilweise vorab gezielte Hypothesen formuliert. Im Verlauf der experimentellen Analysen zeigte sich jedoch, dass einige dieser Annahmen nicht bestätigt wurden. Beobachtungen wie unerwartet niedrige Überlebensraten unter bestimmten Bedingungen führten zur Erweiterung der Analyse um explorative Vergleiche. Ziel war es, mögliche Ursachen für das unzureichende Zellüberleben zu identifizieren. Vor diesem Hintergrund ist die Studie insgesamt als explorativ-konfirmatorisch einzuordnen. Die Analyse der  $p$ -Werte diente vor allem der Identifikation möglicher Effektsignale und nicht der Bestätigung kausaler Zusammenhänge. In diesem Sinne wurden unadjustierte  $p$ -Werte als Instrumente zur Signalerkennung benutzt, um einen Fokus auf das Optimierungspotenzial einer Kryokonservierung zu legen, ohne daraus unmittelbar klinische Entscheidungen abzuleiten.

Demnach konnte Althouse (2016)<sup>234</sup> darstellen, dass eine strikte Korrektur der  $p$ -Werte in explorativen Studien nachrangig ist, sofern transparent kommuniziert wird, dass es sich um

hypothesengenerierende Analysen handelt, deren Ergebnisse vorsichtig interpretiert und in zukünftigen Studien mit größeren Fallzahlen repliziert und validiert werden müssen. Diese methodischen Überlegungen wurden gezielt auf diese Arbeit übertragen, um eine kritische und realistische Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Zudem ist zu betonen, dass sich das Risiko einer Alpha-Fehler-Inflation in Grenzen hält, da die Gesamtanzahl der durchgeführten Tests im Vergleich zu großen epidemiologischen Studien als gering zu bewerten war. Trotzdem wurde insbesondere bei signifikanten Ergebnissen auf eine kritische Interpretation geachtet. Denn nur signifikante Resultate bergen prinzipiell das Risiko eines Fehlers 1. Art, wohingegen nicht signifikante Befunde für sich genommen kein solches Risiko darstellen. Auch dem in der Fachliteratur geforderten transparenten methodischen Vorgehen<sup>234</sup> wurde Rechnung getragen.

Ebenso wurde bewusst häufig von „Beobachtungen“ oder „Tendenzen“ gesprochen, um die Ergebnisse nicht vorschnell im Sinne klassischer Signifikanzlogik zu überhöhen. Dementsprechend liegt der Fokus nicht allein auf dichotomen Entscheidungen wie „signifikant“ oder „nicht signifikant“. <sup>235,236</sup>

So erfordert der Umgang mit statistischen Ergebnissen eine differenzierte und zurückhaltende Interpretation. Zudem sollen Effekte unter Berücksichtigung von Kontext und Plausibilität im Rahmen anderer Studien erfolgen. <sup>236,237</sup>

Außerdem ist anzumerken, dass in den Abbildungen 11 bis 16 ein gepoolter Standardfehler pro Zeitpunkt dargestellt wurde. Dies beeinflusste die Interpretation der Gruppenunterschiede nicht, da die statistischen Tests separat und auf Basis der Rohdaten durchgeführt wurden. Der gepoolte Standardfehler sorgt zudem für eine einheitliche Visualisierung der Messunsicherheit innerhalb eines Zeitpunktes. Im Fließtext wurde hingegen die Standardabweichung berichtet. Die Fehlerbalken dienten somit ausschließlich der Visualisierung der Messvariabilität.

Als weitere Limitation ließ sich die Bewertung der adaptierten Überlebensrate aufführen. Diese nimmt an, dass nicht-wiedergefundene Zellen tot seien. Dies beruhte auf der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit, eine tote Zelle zu erfassen, niedriger war als jene Wahrscheinlichkeit, eine lebendige Zelle zu erfassen. Somit senkte die adaptierte Überlebensrate die relative Überlebensrate in den niedrigeren Bereich. Es sollte jedoch aufgeführt werden, dass nicht-wiedergefundene Zellen lebendig sein könnten. Nichtsdestotrotz schien es aufgrund der niedrigen absoluten Überlebensraten der Gruppen sinnvoll, dass nicht-wiedergefundene Zellen als tot gewertet werden, sodass die Bewertung der relativen Überlebensrate nicht zu optimistisch ausfällt. <sup>67</sup>

Des Weiteren wurde bei der Analyse der Durchmesser angenommen, dass sich die Durchmesser der Zellen vor der Kryokonservierung in den verschiedenen Gruppen nicht stark

voneinander unterschieden. Diese Annahme basierte auf dem gering beobachteten Unterschied der Basis Überlebensraten zwischen den Gruppen, mit Ausnahme der Gruppe S. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde exemplarisch die Gruppe A2 zum Zeitpunkt T0 als Referenz für den Zustand vor der Kryokonservierung genommen.

Bei der Analyse der Cellometer®-Histogramme lässt sich limitierend aufführen, dass lediglich eine exemplarische Platte für die Auswertung der Zelldurchmesser pro dargestellte Gruppe herangezogen wurde. Eine vollständige Betrachtung aller drei Platten pro Gruppe hätte zu einer noch robusteren Beurteilung möglicher Durchmesserunterschiede geführt.

Des Weiteren gilt zu beachten, dass die Zellzahlen auf der Ordinatenachse der Histogramme nicht direkt vergleichbar sind, da im Falle einer geringen Zelldetektion eine erneute Zentrifugation sowie Resuspension des Zellpellets in Abhängigkeit von der Größe erfolgte. So sollten die Histogramme deskriptiv interpretiert werden. Ferner erlauben die Cellometer®-Auswertungen keinen zu starken Rückschluss auf die Überlebensraten, da diese bereits unter standardisierten Bedingungen bestimmt wurden.

Außerdem ließ sich anführen, dass es keine Positiv-Kontrollgruppe für das Filtern der Zellen gab. Dies setzt jedoch voraus, dass der mechanische Stress des Filterns einen signifikanten Effekt auf das Zellüberleben hat. Ob dies der Fall ist, ließe sich durch eine weitere Kontrollgruppe, in welcher die Zellen lediglich gefiltert und nicht kryokonserviert werden, herausfinden.

Ein Störfaktor, der einen maßgeblichen Anteil an der Erniedrigung der Überlebensrate hatte, war die Inkubation der Zellen mit Trypsin. Dies konnte durch Betrachtung der Trypsinkontrollgruppe bestätigt werden. Um lediglich den Effekt der Kryokonservierung bewerten zu können, wurde die korrigierte Überlebensrate eingeführt. Diese rechnete den Effekt der Trypsinierung heraus. Da dies bei den EBs nicht möglich war, sollten die Überlebensraten der Gruppe S mit Vorsicht interpretiert werden. Generell kann limitierend ergänzt werden, inwiefern man den Trypsinierungseffekt aus einer Kontrollgruppe auf die anderen Gruppen, die kryokonserviert wurden, übertragen kann. Überdies sollte als Limitation aufgeführt werden, dass inferenzstatistisch kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate vor und nach der Trypsinierung gefunden werden konnte. Aufgrund der hohen Mittelwertdifferenz, der geringen Stichprobengröße und der aktuellen Studienlage erschien das Einführen der korrigierten Überlebensrate nichtsdestotrotz als sinnvoll, zumal durch die Trypsin-Positivkontrollgruppe eine konstante Tendenz beobachtet werden konnte.

Des Weiteren ließ sich in den Gruppen, in welchen dreidimensionale Aggregate kryokonserviert wurden, nicht bestimmen, ob es sich bei der Wechselwirkung zwischen dem

toxischen Effekt der Kryokonservierung und dem toxischen Effekt der Dissoziation der Zellen um eine Potenzierung oder Addierung an Effekten handelte. Um dies herauszufinden, bedarf es einer genaueren Analyse.

Überdies sollte aufgeführt werden, dass lediglich zwei Kryomedien miteinander verglichen wurden. Möchte man genauer herausfinden, ob beispielsweise die Ethylenglykol-Konzentration verantwortlich für die beobachtete Differenz der Überlebensraten zwischen Gruppe A1 und A2 war, so hätte eine separate Experimentreihe durchgeführt werden müssen. Idealerweise würden sich die Gefriermedien lediglich in der Konzentration an verwendetem Ethylenglykol unterscheiden, sodass ein Bereich identifiziert werden könnte, in welchem die Toxizität des Ethylenglykols für hiPSCs bei Verwendung eines bestimmten Kryokonservierungsprotokolls minimal ist.

An dieser Stelle sollte außerdem erwähnt werden, dass beim Vergleich zwischen 3D-Aggregaten und Einzelzellen sowie beim Vergleich der beiden Protokolle die Gruppe A1 inkludiert wurde. Limitierend war jedoch, dass bei den Vergleichen nicht berücksichtigt wurde, dass sich das Einfriermedium der Gruppe A1 von dem Einfriermedium der anderen Gruppen unterschied. Eine Modifikation des Einfriermediums kann als potenzieller Faktor aufgeführt werden, der bei der Frage, ob beispielsweise Einzelzellen oder 3D-Aggregate die Kryokonservierung besser überleben, einen Einfluss auf das Ergebnis haben kann. Das Beispiel kann zum besseren Verständnis weiter ausgeführt werden. Wurden beispielsweise die beiden Protokolle miteinander verglichen, so wurden alle Gruppen, die mit dem bereits etablierten Protokoll kryokonserviert wurden (Gruppen A1, A2, B1 und B2), mit allen Gruppen paarweise verglichen, die nach dem gynäkologischen Protokoll eingefroren wurden (Gruppen C, D1, D2 und E). Dabei sollte berücksichtigt werden, dass sich teilweise die einzelnen Gruppen in mehreren Faktoren unterschieden. So zeigte der Vergleich zwischen den Gruppen B1 und D2 beispielsweise, dass sich die Gruppen nicht nur in dem eigentlichen Kryokonservierungsprotokoll unterschieden (etabliert vs. gynäkologisch), sondern auch in der Methodik der Dissoziation (mechanisch vs. enzymatisch). Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden. Hätte man stringent die Protokolle miteinander verglichen, so hätte man immer nur zwei Gruppen vergleichen müssen, die sich lediglich in einem Faktor voneinander unterschieden. Da jedoch durch die Gesamtschau mehrerer, paarweiser Vergleiche Tendenzen zu erkennen waren, die mit der aktuellen Studienlage übereinstimmten, wurden zur Analyse der Arbeitshypothesen mehrere Gruppen paarweise miteinander verglichen, um so einen Überblick der Tendenzen über mehrere Gruppen hinweg zu bekommen.

Um den Einfluss der Auftautemperatur von 100°C besser bewerten zu können, hätten verschiedene Auftautemperaturen evaluiert werden können. Folglich hätte eine kritische Temperatur identifiziert werden können, ab welcher das Zellüberleben signifikant sinkt. In diesem Experimentdesign konnte lediglich der Vergleich zwischen zwei Auftautemperaturen bewertet werden. Ob die Zellen von einer Auftautemperatur profitieren, welche im Bereich zwischen 37°C und 100°C liegt, konnte somit nicht evaluiert werden. Dass das Überleben der Zellen vom Zelltyp und von der komplexen Interaktion aus Einfrier- und Auftaurate abhängt, wurde bei der Kryokonservierung von T-Zellen festgestellt.<sup>222</sup> Übertragen auf dieses Experimentdesign hätten mehrere Gruppen verglichen werden können, die mit unterschiedlichen Kühlraten, jedoch derselben Auftautemperatur (z.B. 100°C) behandelt werden würden. Durch Variierung mehrerer möglicher Konstellationen an Einfrier- und Auftauraten könnte so durch *trial and error* eine optimale, auf die hiPSCs individuell zugeschnittene Einfrier- und Auftautemperatur identifiziert werden. Dabei sollte bedacht werden, dass einzelne Erkenntnisse, die beim Einfrieren von Einzelzellen gewonnen werden, nicht unbedingt auf die Kryokonservierung komplexer Systeme übertragen werden können. Dies erhöht die Vielschichtigkeit der kryobiologischen Forschung und zeigt erneut den Forschungsbedarf auf.

Eine generelle Limitation war, dass die Bewertung der Kryokonservierung abhängig von den zu untersuchenden Methoden und Parametern war. Es gibt eine Vielzahl an Methoden, die Rückschlüsse über die Qualität der Kryokonservierung erlauben.

Damit der Einfluss der Kryokonservierung besser bewertet werden kann, hätten beispielsweise die morphologischen Kriterien ausgeweitet werden können. So hätte eine systematische Klassifizierung in Untergruppen vollzogen werden können, sodass die morphologische Qualität der Zellen näher betrachtet werden könnte. Eine Zunahme des Anteils jener Gruppen, die eine inhomogene und denaturierte Morphologie zeigen, könnte so quantitativ erfasst werden. Dies deckt sich mit der Feststellung einer veränderten Morphologie hESCs nach der Kryokonservierung.<sup>30</sup> Ein Nachteil dieser Methode ist, dass dies ein semiquantitatives Verfahren darstellt. Außerdem können Zellen interindividuell in andere Gruppen kategorisiert werden, was die Subjektivität des Verfahrens erhöht.

Ein anderes morphologisches Kriterium, welches vor allem in der Reproduktionsmedizin Anwendung bei der Evaluation von Spermien findet, ist die Chromatin Kondensation. So konnte nach einem Kryokonservierungszyklus ein reduzierter Anteil an kondensiertem Chromatin festgestellt werden.<sup>238</sup>

Auch bei Stammzellen spielt das Chromatin eine wichtige Rolle. Es konnte herausgefunden werden, dass pluripotente, embryonale Stammzellen mehr Euchromatin als hämatopoetische Stammzellen aufwiesen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass bei der Reifung von Zellen



Heterochromatin vermehrt in der nukleären Peripherie vorzufinden war. Außerdem konnte eine Inhibierung der Bildung von Heterochromatin eine verzögerte Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen bewirken.<sup>239</sup> Eine nähere Betrachtung des Chromatin-*Rearrangements* nach einer Kryokonservierung scheint demnach eine sinnvolle Ergänzung zu sein.

Überdies hätte die Nutzung von Kryomikroskopen eine differenzierte Betrachtung der Morphologie als Kriterium erlaubt. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch das Schmelzen von großen Eiskristallen ein erhöhter osmotischer Gradient entstehen kann, welcher zu einer Schädigung der Plasmamembran führen kann.<sup>97</sup>

Auch hätte die Membranintegrität durch Hinzuziehen eines Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskops detaillierter bewertet werden können. Zudem hätte eine dynamische Veränderung der Morphologie durch Langzeitvideomikroskope evaluiert werden können.<sup>65</sup>

Um die Überlebensrate zu verbessern, wird die Verwendung von verschiedenen Molekülen diskutiert. So hätte eine Experimentreihe, in der verschiedene Moleküle zum Einsatz kommen, welche die Überlebensrate modifizieren, eingeführt werden können. Wie bereits erwähnt, scheint Z-VAD-FMK das Zellüberleben zu erhöhen, wenn es in das Einfriermedium hinzugefügt wird<sup>118</sup>. Auch der ROCK-Inhibitor hat einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben von dreidimensionalen hESCs-Aggregaten.<sup>240</sup>

Auch für dissoziierte hESCs konnte eine Erhöhung des Zellüberlebens festgestellt werden, wenn der ROCK-Inhibitor in das Einfriermedium hinzugefügt wurde. Einen Einfluss auf die Bildung von hESCs Kolonien nach dem Auftauen hatte dies jedoch nicht zur Folge. Dies gelang lediglich, wenn der ROCK-Inhibitor zum Auftaumedium hinzugefügt wurde.<sup>27,119,120</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass die Anoikis als wesentlicher Mechanismus für das Absterben von Zellen im Rahmen der Kryokonservierung verantwortlich gemacht werden konnte, da der ROCK-Inhibitor eine wichtige Rolle in Signalwegen der Apoptose und des Zellzyklus spielt.<sup>27,214,241</sup>

Nachteile der Benutzung des ROCK-Inhibitors sind jedoch, dass diese Methodik zeitaufwendiger ist und der Inhibitor die Zellfunktion beeinflussen könnte.<sup>116</sup> Außerdem konnte für hiPSCs-Aggregate gezeigt werden, dass der ROCK-Inhibitor das nichtmuskuläre Myosin IIA (NMMIIA) herunterregulierte, was unter anderem die Zelladhäsion und die Pluripotenz negativ beeinflusste.<sup>242</sup> Dieses Beispiel verdeutlicht somit, dass einzelne Erkenntnisse auf hiPSCs-Einzelnzellen nicht auf hiPSCs-Aggregate übertragen werden können, was die Komplexität der Forschung in der Kryobiologie erhöht.

Ein anderes, vielversprechendes Neurohormon ist Melatonin. Das Hinzufügen von Melatonin im Kryokonservierungsprozess bewirkte eine Erhöhung der Überlebensrate und der Motilität bei Hundespermatozoen<sup>243</sup> sowie eine Erhöhung des Durchmessers der Follikel und der

Überlebensraten bei murinem, ovariellen Gewebe<sup>244</sup>. Auch bei Stammzellen, in diesem Fall Stammzellen von Ziegen, konnte eine erhöhte Überlebensrate durch Melatonin festgestellt werden.<sup>245</sup> Zurückgeführt wurde dies auf antioxidative Eigenschaften des Moleküls.<sup>85</sup>

Generell wäre es sinnvoll, nicht nur Überlebensraten und morphologische Kriterien zu betrachten, sondern auch Genexpressionsanalysen durchzuführen.

So konnte bereits gezeigt werden, dass das Transkriptom von kryokonservierten hESCs erst im späteren Verlauf eine vermehrte Expression von Genen zeigte, welche unter anderem an der Apoptose, der Regeneration sowie der vaskulären Entwicklung beteiligt sind. Demnach scheint es sinnvoll, Signalwege der stressinduzierten Differenzierung und der Anoikis zu inhibieren.<sup>30</sup> Es konnte ferner dargestellt werden, dass eine niedrige Viabilität von 30% 90 Minuten nach dem Auftauen eher auf apoptotische und nicht nekrotische Prozesse zurückgeführt werden konnte.<sup>246</sup> Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Pluripotenzenmarkers Oct3/4 nach der Kryokonservierung kam.<sup>92</sup> Dass das Transkriptom erst im weiteren Verlauf der Kultivierung Veränderungen aufwies, deckte sich mit der beobachteten Erniedrigung der absoluten Überlebensrate nach 24h sowie der beschriebenen Inhibition der Anheftung der Zellen nach dem Auftauen.

Eine Deregulation jener Gene, die im Prozess des Zelltods involviert sind, konnte bereits 3h nach der Kultur und ein Höhepunkt 6h nach der Kultur bei einem Zustand nach einer Kryokonservierung festgestellt werden. Das Niveau der Positivkontrollgruppe wurde in der Studie erst nach ca. 48h erreicht.<sup>30</sup> Die Transkriptomveränderung würde demnach jedoch nicht vollständig die erniedrigten absoluten Überlebensraten zum Zeitpunkt T1 erklären. Die bereits beschriebenen Gefrierschäden konnten hierfür als mögliche Ursache aufgeführt werden, wobei sich nicht ausschließen ließ, dass Veränderungen im Transkriptom ebenso dafür verantwortlich gemacht werden konnten.

Folglich würde eine Genexpressionsanalyse eine effiziente Strategie darstellen, um essenzielle, biomolekulare Signalwege zu identifizieren, welche zu der Erniedrigung der Überlebensraten nach einem Kryokonservierungszyklus beitragen. Aufgrund der hohen Kosten dieser Technik erschien es sinnvoller, zunächst das Protokoll der Kryokonservierung anhand der Überlebensraten und der Morphologie zu bewerten, um das Protokoll auf diese Parameter zu optimieren. Erst im darauffolgenden Schritt wäre eine Betrachtung der Genexpression sinnvoll, um die Funktionalität der Stammzellen bewerten zu können. Im Rahmen dessen hätte ebenso eine Differenzierung der hiPSCs nach der Kryokonservierung sinnhaft sein können. So hätten beispielsweise hiPSC-CMs auf die Expression kardialer Marker überprüft werden können. Dazu gehören beispielsweise die Myosin-Schwerketten und  $\alpha$ -Aktinin.<sup>247</sup>

Insgesamt gilt es anzumerken, dass erst die Diversität an Methoden eine detaillierte Evaluation der Funktionalität der Zelle erlaubt. So sollte dies nicht nur auf die Zelle, sondern auf eine ganze Zellpopulation ausgeweitet und der zeitlich dynamische Verlauf berücksichtigt werden.<sup>65</sup> Die Diskussion der Überlebensraten zeigte, dass die Überlebensrate nicht das einzige, determinierende Kriterium für die Bewertung der Qualität der Kryokonservierung ist. Ferner sollte die Zellaktivität mitbestimmt werden.<sup>67</sup>

Als weitere Limitation konnte der Fakt aufgeführt werden, dass sich aufgrund der Vielzahl an Unterschieden zwischen dem gynäkologischen und dem etablierten Protokoll sowie aufgrund der generellen Methodik nicht identifizieren ließ, welcher Teilschritt bzw. welcher Mechanismus für den beobachteten Unterschied der beiden Protokolle am ehesten verantwortlich war. Demnach war davon auszugehen, dass ein komplexes Zusammenspiel aus mehreren Faktoren zur Erniedrigung der Überlebensrate der mit dem gynäkologischen Protokoll eingefrorenen Zellen beitrug.

Dies führte zu einer generellen Problematik. Eine genaue Analyse des Effekts der generellen Kryokonservierung auf das Zellüberleben ließ sich schwierig quantifizieren. Dies lag in der Methodik begründet. Um die Überlebensrate von kryokonservierten Zellen analysieren zu können, mussten nach dem Auftauen mehrere Teilschritte bis zur eigentlichen Bestimmung der Überlebensrate erfolgen. So ließ sich nicht quantifizieren, inwiefern nicht der Kryokonservierungsprozess, sondern die anderen Zwischenschritte die Überlebensrate beobachtbar erniedrigten. Darunter zählte beispielsweise die mechanische Schädigung der Zellen durch eine Resuspension. Je nach Erfahrung des Experimentators mit einer humanen Zellkultur variiert außerdem das Überleben der Zellen.

Es ließ sich jedoch einschätzen, dass der Einfluss solcher Schädigungsmechanismen eher als niedrig einzustufen war. Dies liegt darin begründet, dass viele der Teilschritte der Kryokonservierung im Ablauf jenen Prozessen ähneln, die in der gewöhnlichen Zellkultur Anwendung finden. Darunter fallen beispielsweise Prozesse der Dissoziation von Zellen oder der sanften Resuspension. Dass bereits vor der Kryokonservierung die Überlebensrate nicht 100% entsprach, zeigte die Basis Überlebensrate.

Generell lässt sich sagen, dass durch die Vielzahl an zu verändernden Parametern bei der Kryokonservierung von hiPSCs eine systematische Analyse schwierig durchzuführen scheint, sodass teilweise erst durch *trial and error* eine Verbesserung bestehender Protokolle erzielt werden kann.

Die Vielzahl an Limitationen zeigt, dass es durch die Komplexität der Kryokonservierung mehr Studien bedarf, die sich mit dieser Thematik beschäftigen, um so ein Protokoll zur langfristigen und skalierbaren Kryokonservierung von hiPSCs generieren zu können.

### **5.10. Ausblick**

Eine Kryokonservierung mit dem etablierten Protokoll und dem gynäkologischen Einfriermedium lieferte für hiPSCs als Einzelzellsuspension stabile absolute Überlebensraten im Bereich von ca. 60%. Wurden 3D-Aggregate kryokonserviert, so konnten absolute Überlebensraten im Bereich von ca. 30% erreicht werden. Das Erreichen höherer Überlebensraten, insbesondere für 3D-Aggregate, wäre für die Etablierung eines skalierbaren Protokolls von Vorteil. Um dies zu erreichen, muss das bestehende Protokoll in Hinblick auf Einfrier- und Auftauraten, das Einfriermedium und den Zusatz von Molekülen optimiert werden. Auch eine möglichst homogene Perfusion des 3D-Aggregates gilt es zu erreichen. Dies erfordert eine Vielzahl an Studien, um die genannten Parameter in Hinblick auf eine Maximierung der Überlebensrate zu optimieren.

So konnte bereits festgestellt werden, dass das Verständnis kryobiologischer Prozesse aufgrund der Komplexität dynamischer Zusammenhänge beschränkt ist, da der Wissensgewinn auf manuellen Durchführungen der Experimente basiert. Demnach kommt der Etablierung automatisierter Einfriermaschinen eine hohe Bedeutung zu.<sup>65</sup>

Überdies behindert eine unzureichende Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus der Reproduktionsmedizin auf die Stammzellforschung die Etablierung eines skalierbaren Protokolls zur Kryokonservierung von hiPSCs.

Ein vielversprechender Ansatz stellen mikrofluide Systeme dar, welche durch erhöhte räumliche Verteilung der chemischen Begebenheiten eine verbesserte Mikroumgebung dreidimensionaler Aggregate ermöglichen.<sup>248</sup> So gelingt, unter anderem durch eine Bildgebung in Echtzeit, eine präzisere Kontrolle der Mikroumgebung der Stammzellen.<sup>249</sup>

Beispielsweise durch eine Zwei-Fluid-Sonde können Kompartimente innerhalb des Mediums geschaffen werden. In diesen Kompartimenten können über Ventile bestimmte Lösungen zu den Zellen hinzugefügt werden.<sup>65</sup>

Ein anderes Verfahren ist die Hanging-Drop-Methode, die zur Differenzierung von Stammzellen zu EBs benutzt wird.<sup>250</sup> Ein Vorteil dieser Methode ist, dass durch ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen die Kühlrate sehr hoch gewählt werden kann. Eine direkte Kontamination der Zellen mit dem Flüssigstickstoff kann verhindert werden, da sich die Zellen in Schlauchsystemen befinden, welche direkt in Flüssigstickstoff gelagert werden. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei der Methode um eine Verglasung der Zellen.<sup>65</sup>

Nachteil dieser Methode ist somit, dass aufgrund des geringen Tropfenvolumens keine skalierbare Methode zur Kryokonservierung von Zellen entwickelt werden kann. So werden in der Zelltherapie schätzungsweise  $10^9$  -  $10^{10}$  PSC-CMs für die intramyokardiale Injektion beim Myokardinfarkt im Schweinmodell benötigt. Dem gegenüber stehen  $10^6$  -  $10^7$  Hanging Drops, um eine derart hohe Zellzahl zu generieren.<sup>155</sup>

Ein Vorteil der mikrofluiden Systeme ist, dass den Zellen kleine, eigene Kompartimente zur Verfügung stehen, sodass dies eine Vielzahl von Experimentreihen erlaubt, ohne einen zu hohen Materialverbrauch zu verzeichnen.<sup>65</sup>

Auch Microcarrier scheinen den Bereich der Kryokonservierung zu revolutionieren.

Der Einsatz von Microcarriern erlaubt es einige Nachteile der Kryokonservierung von adhären Kolonien zu umgehen. Diese setzen sich prinzipiell aus dem Problem der Nicht-Skalierbarkeit sowie der Gefahr der Kontamination durch Flüssigstickstoff zusammen.<sup>27</sup>

Wie vielversprechend Microcarrier Ansätze sind, zeigt eine Studie aus dem Jahr 2009. Dabei konnte gezeigt werden, dass hESCs, die auf MEF-Microcarriern kryokonserviert wurden, eine 1,5- bis 1,9-fach höhere Genesungsrate aufwiesen als hESCs, die als freie Kolonien eingefroren wurden. Als Microcarrier wurde Cytodex 3 verwendet. Überdies konnte dargestellt werden, dass die hESCs nach der Kryokonservierung eine hohe Expression an Oct3/4 aufwiesen, was für den Erhalt der Pluripotenz spricht.<sup>115</sup>

So konnte gezeigt werden, dass eine intakte Zelladhäsion für ein erhöhtes Zellüberleben unabdingbar ist. Dies wird auf den Erhalt von interzellulären Kontakten, zum Beispiel Gap Junctions, sowie auf die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrixsignalisierung zurückgeführt.<sup>27,115,118</sup>

Nachteile der Methode hingegen sind, dass Trypsin zur Ablösung der hESCs von den Microcarriern benutzt wurde, die Aussaatseffizienz noch sehr gering war und das Kulturmedium xenogene Bestandteile enthielt.<sup>115</sup> Nichtsdestotrotz zeigten die Ergebnisse, dass der gezielte Einsatz von Microcarriern einen vielversprechenden Ansatz in der skalierbaren Kryokonservierung von hiPSCs darstellt.<sup>27</sup> Insbesondere die Generierung von skalierbarem Mikrogewebe durch Verkapselung der Zellen, die eine spätere, kontrollierte Freisetzung der Zellen erlaubt, scheint besonders aussichtsreich. Hierbei sei beispielsweise PNIPAAm genannt, das bei mikrofluiden Ansätzen zur Verkapselung von Stammzellen benutzt werden kann.<sup>155</sup>

Überdies stellen neue Technologien beim Auftauen der Zellen, zum Beispiel die Nanoerwärmung bzw. die Radiofrequenz-Erwärmung, vielversprechende Ansätze dar. Durch Nanoerwärmung erreichte man 2021 signifikant erhöhte Überlebensraten von kryokonservierten, murinen Nieren.<sup>251</sup>

In Zukunft wird die Etablierung eines skalierbaren Protokolls von hoher Bedeutung sein. Die Kryokonservierung komplexer Systeme, insbesondere ganzer Gewebe und Organe, stellt die Kryoforschung vor eine große Herausforderung. Da das menschliche Herz neben Kardiomyozyten auch aus kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen besteht<sup>252</sup>, setzt eine Kryokonservierung des Herzens das optimale Einfrieren verschiedener Zelltypen mit unterschiedlichen Eigenschaften voraus. Dies erhöht den Anspruch an ein Kryokonservierungsprotokoll. Inwiefern sich die Kryoeigenschaften dieser Zellen voneinander unterscheiden und wie sich die Zellen möglicherweise gegenseitig im 3D-Aggregat beeinflussen, gilt es näher herauszufinden.

Nichtsdestotrotz sollte zunächst die Kryokonservierung einfacher Systeme optimiert werden, damit die Erkenntnisse zur Optimierung der Kryokonservierung größerer, dreidimensionaler Organe genutzt werden können.

Eine erfolgreiche und skalierbare Kryokonservierung gilt als unabdingbare Voraussetzung für eine langfristige Lagerung und folglich für eine klinische Anwendung der hiPSCs.

Auf der einen Seite stellt die Kryokonservierung von Stammzellen aufgrund ihrer allgemeinen Vulnerabilität und der komplexen Anforderungen an Einfrier- und Auftauprotokolle eine Herausforderung dar. Auf der anderen Seite ist die kryobiologische Stammzellforschung aufgrund der Eigenschaften von Stammzellen zukunftsorientiert und konnte, unter anderem mit dieser Arbeit, bereits Erfolge verzeichnen, an die es anzuknüpfen gilt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Plass D, Vos T, Hornberg C, Scheidt-Nave C, Zeeb H, Krämer A. Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study. *Dtsch Arztebl Int* 2014; **111**(38): 629-38.
2. Finger JD, Busch MA, Du Y, et al. Time Trends in Cardiometabolic Risk Factors in Adults. *Dtsch Arztebl Int* 2016; **113**(42): 712-9.
3. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. *Nat Rev Cardiol* 2022; **19**(2): 133-43.
4. Herold G. Innere Medizin. Berlin, Boston: De Gruyter; 2020.
5. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2016; **37**(29): 2315-81.
6. Holstiege J, Akmatov M, Steffen A, Bätzing J. Prävalenz der Herzinsuffizienz – bundesweite Trends, regionale Variationen und häufige Komorbiditäten. *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi) Versorgungsatlas-Bericht* 2018; **18**(09).
7. Statistisches Bundesamt. Krankheitskosten, Krankheitskosten je Einwohner: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10) 2022 (accessed 12. November 2022).
8. Statistisches Bundesamt. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten. 2017 (accessed 12 November 2022).
9. Shao C, Wang J, Tian J, Tang YD. Coronary Artery Disease: From Mechanism to Clinical Practice. *Adv Exp Med Biol* 2020; **1177**: 1-36.
10. Vähätalo J, Holmström L, Pakanen L, et al. Coronary Artery Disease as the Cause of Sudden Cardiac Death Among Victims < 50 Years of Age. *Am J Cardiol* 2021; **147**: 33-8.
11. Larsen R. Akutes Koronarsyndrom (ACS) und akuter Myokardinfarkt. *Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege* 2016; **14**: 680-90.
12. Jayaprasad N. Heart Failure in Children. *Heart Views* 2016; **17**(3): 92-9.
13. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Heart Fail* 2018; **6**(3): 179-86.
14. Bundesärztekammer. Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz. 2019; **3**(3).
15. Rossignol P, Hernandez AF, Solomon SD, Zannad F. Heart failure drug treatment. *Lancet* 2019; **393**(10175): 1034-44.
16. Rossano JW, Kim JJ, Decker JA, et al. Prevalence, morbidity, and mortality of heart failure-related hospitalizations in children in the United States: a population-based study. *J Card Fail* 2012; **18**(6): 459-70.
17. Gibbs C, Jackson G, Lip G. ABC of heart failure. Non-drug management. *BMJ* 2000; **320**(7231): 366-9.
18. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021; **42**(36): 3599-726.
19. Truby LK, Rogers JG. Advanced Heart Failure: Epidemiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *JACC Heart Fail* 2020; **8**(7): 523-36.
20. Strueber M, Meyer AL, Malehsa D, Kugler C, Simon AR, Haverich A. The Current Status of Heart Transplantation and the Development of Artificial Heart Systems. *Dtsch Arztebl International* 2009; **106**(28-29): 471-7.
21. Niehaus H, Haverich A, Ius F. [Current status of transplantation medicine in the field of heart and lung transplantation : Legal regulations and clinical implementation]. *Anaesthesiologie* 2022; **71**(9): 727-38.
22. Alraies MC, Eckman P. Adult heart transplant: indications and outcomes. *J Thorac Dis* 2014; **6**(8): 1120-8.
23. Lanfear AT, Hamandi M, Fan J, DiMaio JM, George TJ. Trends in HeartMate 3: What we know so far. *J Card Surg* 2020; **35**(1): 180-7.

24. Han JJ, Acker MA, Atluri P. Left Ventricular Assist Devices. *Circulation* 2018; **138**(24): 2841-51.
25. Kikuchi K, Poss KD. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; **28**: 719-41.
26. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**(5391): 1145-7.
27. Martin Ibanez R, Hovatta O, M. Canals J, Josep MC. Cryopreservation of Human Pluripotent Stem Cells: Are We Going in the Right Direction? In: Igor IK, ed. *Current Frontiers in Cryobiology*. Rijeka: IntechOpen; 2012: Ch. 5.
28. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**(4): 663-76.
29. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**(5): 861-72.
30. Wagh V, Meganathan K, Jagtap S, et al. Effects of cryopreservation on the transcriptome of human embryonic stem cells after thawing and culturing. *Stem Cell Rev Rep* 2011; **7**(3): 506-17.
31. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010; **120**(1): 51-9.
32. Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; **457**(7227): 277-80.
33. Bose A, Petsko GA, Studer L. Induced pluripotent stem cells: a tool for modeling Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2022; **45**(8): 608-20.
34. Zhang F, Yu C, Xu W, et al. Identification of critical genes and molecular pathways in COVID-19 myocarditis and constructing gene regulatory networks by bioinformatic analysis. *PLoS One* 2022; **17**(6): e0269386.
35. de Boer RA, Heymans S, Backs J, et al. Targeted therapies in genetic dilated and hypertrophic cardiomyopathies: from molecular mechanisms to therapeutic targets. A position paper from the Heart Failure Association (HFA) and the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 2022; **24**(3): 406-20.
36. Criscione J, Rezaei Z, Hernandez Cantu CM, Murphy S, Shin SR, Kim DH. Heart-on-a-chip platforms and biosensor integration for disease modeling and phenotypic drug screening. *Biosens Bioelectron* 2023; **220**: 114840.
37. Wang PH, Fang YH, Liu YW, Yeh ML. Merits of hiPSC-Derived Cardiomyocytes for In Vitro Research and Testing Drug Toxicity. *Biomedicines* 2022; **10**(11).
38. Ito A, Yoshioka K, Masumoto S, et al. Magnetic heating of nanoparticles as a scalable cryopreservation technology for human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 13605.
39. Uyama H, Mandai M, Takahashi M. Stem-cell-based therapies for retinal degenerative diseases: Current challenges in the establishment of new treatment strategies. *Dev Growth Differ* 2021; **63**(1): 59-71.
40. Sun SJ, Li F, Dong M, et al. Repeated intravenous administration of hiPSC-MSCs enhance the efficacy of cell-based therapy in tissue regeneration. *Commun Biol* 2022; **5**(1): 867.
41. Yuasa S. Recent Technological Innovations to Promote Cardiovascular Research. *Circ J* 2022; **86**(6): 919-22.
42. Maring JA, Lodder K, Mol E, et al. Cardiac Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce Infarct Size and Associate with Increased Cardiovascular Cell Proliferation. *J Cardiovasc Transl Res* 2019; **12**(1): 5-17.
43. Ishigami S, Sano T, Krishnapura S, Ito T, Sano S. An overview of stem cell therapy for paediatric heart failure. *Eur J Cardiothorac Surg* 2020; **58**(5): 881-7.
44. Curtis MW, Russell B. Cardiac tissue engineering. *J Cardiovasc Nurs* 2009; **24**(2): 87-92.
45. Sharma V, Dash S, Govarthanan K, et al. Recent Advances in Cardiac Tissue Engineering for the Management of Myocardium Infarction. *Cells* 2021; **10**(10): 2538.



46. Querdel E, Reinsch M, Castro L, et al. Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner. *Circulation* 2021; **143**(20): 1991-2006.
47. Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, et al. Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation* 2017; **135**(19): 1832-47.
48. Tang J, Vandergriff A, Wang Z, et al. A Regenerative Cardiac Patch Formed by Spray Painting of Biomaterials onto the Heart. *Tissue Eng Part C Methods* 2017; **23**(3): 146-55.
49. Hamad S, Derichsweiler D, Papadopoulos S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in 2D monolayer and scalable 3D suspension bioreactor cultures with reduced batch-to-batch variations. *Theranostics* 2019; **9**(24): 7222-38.
50. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* 2013; **40**(6): 463-71.
51. Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N, Stojkovic M. Human stem cell research and regenerative medicine--present and future. *Br Med Bull* 2011; **99**: 155-68.
52. Dias C, Nylandsted J. Plasma membrane integrity in health and disease: significance and therapeutic potential. *Cell Discov* 2021; **7**(1): 4.
53. Cooper G. The Cell: A Molecular Approach. Sunderland (USA) Sinauer Associates 2000.
54. Cooper ST, McNeil PL. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. *Physiol Rev* 2015; **95**(4): 1205-40.
55. Jimenez AJ, Perez F. Plasma membrane repair: the adaptable cell life-insurance. *Curr Opin Cell Biol* 2017; **47**: 99-107.
56. Kitmitto A, Baudoin F, Cartwright EJ. Cardiomyocyte damage control in heart failure and the role of the sarcolemma. *J Muscle Res Cell Motil* 2019; **40**(3-4): 319-33.
57. Clarke MS, Caldwell RW, Chiao H, Miyake K, McNeil PL. Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ Res* 1995; **76**(6): 927-34.
58. Wang X, Xie W, Zhang Y, et al. Cardioprotection of ischemia/reperfusion injury by cholesterol-dependent MG53-mediated membrane repair. *Circulation research* 2010; **107**(1): 76-83.
59. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 2017; **6**(1): 12-8.
60. Bojic S, Murray A, Bentley BL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol* 2021; **19**(1): 56.
61. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; **164**(4172): 666.
62. Schnebly R. „A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury: Evidence from Chinese Hamster Tissue-Culture Cells“ (1972) by Peter Mazur, Stanley Leibo, and Ernest Chu. 2021 (accessed 13.11 2022).
63. Sarder MR, Sarker MF, Saha SK. Cryopreservation of sperm of an indigenous endangered fish species *Nandus nandus* (Hamilton, 1822) for ex-situ conservation. *Cryobiology* 2012; **65**(3): 202-9.
64. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 2014; **102**(1): 19-26.
65. Schulz J. Vergleichende Untersuchung zur Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen: Verbesserte funktionserhaltende Kryokonservierung für therapeutisch relevante Zellsysteme; 2011.
66. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2011.
67. Pasch J. Kryokonservierung epidermaler Zellen auf Kollagen-Microcarriern; 2000.
68. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; **168**(3934): 939-49.
69. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972; **71**(2): 345-55.
70. Meryman HT. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature* 1968; **218**(5139): 333-6.

71. Meryman HT. Absence of unfrozen freezable water in rapidly frozen red cells. *Cryobiology* 1970; **7**(4): 252-5.
72. Ehrhart F. Untersuchungen zur Kryokonservierung und Einschlussimmobilisierung therapeutisch relevanter Zellsysteme; 2008.
73. Williams RJ, Willemot C, Hope HJ. The relationship between cell injury and osmotic volume reduction. IV. The behavior of hardy wheat membrane lipids in monolayer. *Cryobiology* 1981; **18**(2): 146-54.
74. Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 1984; **223**(4637): 701-3.
75. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng* 2003; **82**(6): 684-90.
76. Briard JG, Poisson JS, Turner TR, Capicciotti CJ, Acker JP, Ben RN. Small molecule ice recrystallization inhibitors mitigate red blood cell lysis during freezing, transient warming and thawing. *Sci Rep* 2016; **6**: 23619.
77. Sansinena M, Santos MV, Taminelli G, Zaritky N. Implications of storage and handling conditions on glass transition and potential devitrification of oocytes and embryos. *Theriogenology* 2014; **82**(3): 373-8.
78. Athurupana R, Ioki S, Funahashi H. Rapid thawing and stabilizing procedure improve postthaw survival and in vitro penetrability of boar spermatozoa cryopreserved with a glycerol-free trehalose-based extender. *Theriogenology* 2015; **84**(6): 940-7.
79. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002; **17**(3): 704-9.
80. Zhang JZ, Belbachir N, Zhang T, Liu Y, Shrestha R, Wu JC. Effects of Cryopreservation on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Assessing Drug Safety Response Profiles. *Stem Cell Reports* 2021; **16**(1): 168-81.
81. Wang Y, Zhou Y, Ali M, et al. Comparative Analysis of piRNA Profiles Helps to Elucidate Cryoinjury Between Giant Panda and Boar Sperm During Cryopreservation. *Frontiers in Veterinary Science* 2021; **8**: 635013.
82. Takahashi T, Bross JB, Shaber RE, Williams RJ. Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells. *Cryobiology* 1985; **22**(4): 336-50.
83. Møbjerg A, Kodama M, Ramos-Madrugal J, et al. Extreme freeze-tolerance in cryophilic tardigrades relies on controlled ice formation but does not involve significant change in transcription. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2022; **271**: 111245.
84. Storey KB, Storey JM. Biochemical adaption for freezing tolerance in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology B* 1984; **155**(1): 29-36.
85. Marcantonini G, Bartolini D, Zatini L, et al. Natural Cryoprotective and Cytoprotective Agents in Cryopreservation: A Focus on Melatonin. *Molecules* 2022; **27**(10).
86. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* 2016; **169**: 2-5.
87. Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; **11**(1): 28-36.
88. Lovelock JE. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* 1954; **56**(2): 265-70.
89. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; **247**(3 Pt 1): C125-42.
90. Szurek EA, Eroglu A. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One* 2011; **6**(11): e27604.
91. Bhattacharya S. Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. In: Yusuf B, ed. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. Rijeka: IntechOpen; 2018: Ch. 2.
92. Katkov, II, Kim MS, Bajpai R, et al. Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* 2006; **53**(2): 194-205.
93. Bauer P, Weber M, Mur JM, et al. Transient non-cardiogenic pulmonary edema following massive ingestion of ethylene glycol butyl ether. *Intensive Care Med* 1992; **18**(4): 250-1.

94. Vanderzwalmen P, Connan D, Grobet L, et al. Lower intracellular concentration of cryoprotectants after vitrification than after slow freezing despite exposure to higher concentration of cryoprotectant solutions. *Hum Reprod* 2013; **28**(8): 2101-10.
95. Paynter SJ, Cooper A, Gregory L, Fuller BJ, Shaw RW. Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the cryoprotectant dimethylsulphoxide. *Hum Reprod* 1999; **14**(9): 2338-42.
96. Levin RL, Miller TW. An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: isolated cells. *Cryobiology* 1981; **18**(1): 32-48.
97. Huang H, Zhao G, Zhang Y, Xu J, Toth TL, He X. Predehydration and Ice Seeding in the Presence of Trehalose Enable Cell Cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng* 2017; **3**(8): 1758-68.
98. Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems. *Transfus Apher Sci* 2012; **46**(2): 137-47.
99. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? *Nature* 1969; **222**(5199): 1175-6.
100. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; **49**(5): 743-64.
101. Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 1996; **33**(4): 459-64.
102. Golovina E, Golovin A, Hoekstra F, Faller R. Water Replacement Hypothesis in Atomic Detail—Factors Determining the Structure of Dehydrated Bilayer Stacks. *Biophysical journal* 2009; **97**: 490-9.
103. Arutyunyan IV, Kananykhina EY, Elchaninov AV, Fatkhudinov TK. Influence of Sucrose on the Efficiency of Cryopreservation of Human Umbilical Cord-Derived Multipotent Stromal Cells with the Use of Various Penetrating Cryoprotectants. *Bull Exp Biol Med* 2021; **171**(1): 150-5.
104. Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003; **9**(6): 583-605.
105. Luyet BJ. The Vitrification of Organic Colloids and of Protoplasm: *Biodynamica*; 1937.
106. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**(1): 53-8.
107. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006; **12**(6): 779-96.
108. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; **24**(5): 387-402.
109. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 2001; **16**(10): 2187-94.
110. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, et al. Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2006; **13**(2): 228-34.
111. Shaw PW, Fuller BJ, Bernard A, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes: improved rates of survival, fertilization, and development to blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1991; **29**(4): 373-8.
112. Hunt CJ, Timmons PM. Cryopreservation of human embryonic stem cell lines. *Methods Mol Biol* 2007; **368**: 261-70.
113. Aalders J, Van den Vreken N, Popovic M, Mishra S, Heindryckx B, van Hengel J. Robust protocol for feeder-free adaptation of cryopreserved human pluripotent stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2019; **55**(10): 777-83.
114. Heng BC, Bested SM, Chan SH, Cao T. A proposed design for the cryopreservation of intact and adherent human embryonic stem cell colonies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; **41**(3-4): 77-9.
115. Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM, Palecek SP. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Prog* 2009; **25**(1): 20-31.

116. Nishigaki T, Teramura Y, Nasu A, Takada K, Toguchida J, Iwata H. Highly efficient cryopreservation of human induced pluripotent stem cells using a dimethyl sulfoxide-free solution. *Int J Dev Biol* 2011; **55**(3): 305-11.
117. Adler S, Pellizzer C, Paparella M, Hartung T, Bremer S. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicol In Vitro* 2006; **20**(3): 265-71.
118. Heng BC, Clement MV, Cao T. Caspase inhibitor Z-VAD-FMK enhances the freeze-thaw survival rate of human embryonic stem cells. *Biosci Rep* 2007; **27**(4-5): 257-64.
119. Martín-Ibañez R, Unger C, Strömberg A, Baker D, Canals JM, Hovatta O. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Hum Reprod* 2008; **23**(12): 2744-54.
120. Martín-Ibañez R, Strömberg AM, Hovatta O, Canals JM. Cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells in the presence of ROCK inhibitor. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2009; **Chapter 1**: Unit 1C.8.
121. Li Y, Tan JC, Li LS. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertil Steril* 2010; **93**(3): 999-1005.
122. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 1996; **17**(3): 243-56.
123. Borel Rinkes IH, Toner M, Ezzell RM, Tompkins RG, Yarmush ML. Effects of dimethyl sulfoxide on cultured rat hepatocytes in sandwich configuration. *Cryobiology* 1992; **29**(4): 443-53.
124. Carpenter JF, Dawson PE. Quantitation of dimethyl sulfoxide in solutions and tissues by high-performance liquid chromatography. *Cryobiology* 1991; **28**(3): 210-5.
125. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; **21**(4): 407-26.
126. Fahy GM, Saur J, Williams RJ. Physical problems with the vitrification of large biological systems. *Cryobiology* 1990; **27**(5): 492-510.
127. Acker JP, Larese A, Yang H, Petrenko A, McGann LE. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology* 1999; **38**(4): 363-71.
128. Li R, Hornberger K, Dutton JR, Hubel A. Cryopreservation of Human iPS Cell Aggregates in a DMSO-Free Solution-An Optimization and Comparative Study. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; **8**: 1.
129. T'Joene V, De Grande L, Declercq H, Cornelissen M. An efficient, economical slow-freezing method for large-scale human embryonic stem cell banking. *Stem Cells Dev* 2012; **21**(5): 721-8.
130. Konstantinow A, Mühlbauer W, Hartinger A, von Donnersmarck GG. Skin banking: a simple method for cryopreservation of split-thickness skin and cultured human epidermal keratinocytes. *Ann Plast Surg* 1991; **26**(1): 89-97.
131. Jashari R. Transplantation of cryopreserved human heart valves in Europe: 30 years of banking in Brussels and future perspectives. *Cell Tissue Bank* 2021; **22**(4): 519-37.
132. Arav A. Cryopreservation by Directional Freezing and Vitrification Focusing on Large Tissues and Organs. *Cells* 2022; **11**(7).
133. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 2009; **5**(3): 119-26.
134. Hovatta O, Silye R, Krausz T, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996; **11**(6): 1268-72.
135. Rivas Leonel EC, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfus Med Hemother* 2019; **46**(3): 173-81.
136. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; **364**(9443): 1405-10.
137. Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, Orrico C, Di Tommaso B, Venturoli S. Cryopreservation of human ovarian tissue. *Cell Tissue Bank* 2006; **7**(2): 123-33.
138. Lass A, Silye R, Abrams DC, et al. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997; **12**(5): 1028-31.

139. Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Müller J, Yding Andersen C. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod* 2003; **18**(6): 1158-64.
140. Leporrier M, von Theobald P, Roffe JL, Muller G. A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation. Heterotopic ovarian autotransplantation. *Cancer* 1987; **60**(9): 2201-4.
141. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 1994; **9**(4): 597-603.
142. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* 2009; **138**(2): 319-27.
143. Isachenko V, Isachenko E, Keck G, et al. First live birth in germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation. *Clin Lab* 2012; **58**(9-10): 933-8.
144. Gallardo M, Paulini F, Corral A, et al. Evaluation of a new freezing protocol containing 20% dimethyl sulphoxide concentration to cryopreserve human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2018; **37**(6): 653-65.
145. Arav A, Patrizio P. Techniques of Cryopreservation for Ovarian Tissue and Whole Ovary. *Clin Med Insights Reprod Health* 2019; **13**: 1179558119884945.
146. Courbiere B, Caquant L, Mazoyer C, Franck M, Lornage J, Salle B. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril* 2009; **91**(6): 2697-706.
147. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013; **99**(6): 1514-22.
148. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, et al. Simplified technique of human ovarian tissue freezing: quick cooling from -36 degree C. *Cryo Letters* 2008; **29**(3): 261-8.
149. Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, Montag M, Braun F, van der Ven H. Cryopreservation of human ovarian tissue: effect of spontaneous and initiated ice formation. *Reprod Biomed Online* 2008; **16**(3): 336-45.
150. Isachenko V, Maettner R, Sterzik K, et al. In-vitro culture of human embryos with mechanical micro-vibration increases implantation rates. *Reprod Biomed Online* 2011; **22**(6): 536-44.
151. Isachenko V, Du X, Isachenko E, et al. Banking of human ovarian tissue potentially contaminated by cancer cells: experimental model for study of cryo-stability of these cells. *Cell Tissue Bank* 2020; **21**(1): 57-63.
152. Teixeira M, Buff S, Desnos H, et al. Ice nucleating agents allow embryo freezing without manual seeding. *Theriogenology* 2017; **104**: 173-8.
153. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth F, Dessole S, van der Ven H. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration. *Hum Reprod* 2004; **19**(3): 660-5.
154. Imhof M, Hofstetter G, Bergmeister I H, et al. Cryopreservation of a whole ovary as a strategy for restoring ovarian function. *J Assist Reprod Genet* 2004; **21**(12): 459-65.
155. Jahn P, Karger RK, Soso Khalaf S, et al. Engineering of cardiac microtissues by microfluidic cell encapsulation in thermoshrinking non-crosslinked PNIPAAm gels. *Biofabrication* 2022; **14**(3).
156. Reissis Y, García-Gareta E, Korda M, Blunn GW, Hua J. The effect of temperature on the viability of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2013; **4**(6): 139.
157. Sutradhar B, Park J, Hong G, Kim G. Effects of Trypsinization on Viability of Equine Chondrocytes in Cell Culture. *Pakistan Veterinary Journal* 2010; **30**(4): 232-8.
158. Lang F, Gulbins E, Szabo I, et al. Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 2004; **17**(5): 473-80.
159. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 2011; **740**: 7-12.
160. Tsuji K, Ojima M, Otabe K, et al. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 2017; **26**(6): 1089-102.

161. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990; **1**(1): 43-6.
162. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *Bmj* 1998; **316**(7139): 1236-8.
163. Lee T-J, Wu T, Kim Y-J, Park J-H, Lee D-S, Bhang S. Alternative method for trypsin-based cell dissociation using poly (amino ester) coating and pH 6.0 PBS. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2021; **36**: 77-89.
164. Dong X, Li M, Li Q, et al. Effects of Cryopreservation on Microparticles Concentration, Procoagulant Function, Size Distribution, and Morphology. *Med Sci Monit* 2019; **25**: 6675-90.
165. Funk Y, Haase H, Remmers J, Nussli N, Deml B. Entwicklung und Validierung einer computerbasierten Aufgabe zur Induktion eines psychischen Beanspruchungsspektrums. *Zeitschrift für Arbeitswissenschaft* 2022; **76**(2): 129-45.
166. Lam MT, Longaker MT. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; **6 Suppl 3**(0 3): s80-6.
167. Katkov, II, Kan NG, Cimadamore F, Nelson B, Snyder EY, Terskikh AV. DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2011; **2011**: 981606.
168. Améen C, Strehl R, Björquist P, Lindahl A, Hyllner J, Sartipy P. Human embryonic stem cells: current technologies and emerging industrial applications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; **65**(1): 54-80.
169. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Faseb j* 2014; **28**(3): 1317-30.
170. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* 2009; **34**(1): 1-10.
171. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. *Mol Reprod Dev* 1990; **26**(3): 227-35.
172. Tunçer S, Gurbanov R, Sheraj I, Solel E, Esenturk O, Banerjee S. Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 14828.
173. Pal R, Mamidi MK, Das AK, Bhonde R. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Arch Toxicol* 2012; **86**(4): 651-61.
174. Smagur A, Mitrus I, Giebel S, et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sang* 2013; **104**(3): 240-7.
175. Awan M, Buriak I, Fleck R, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med* 2020; **15**(3): 1463-91.
176. Holm F, Ström S, Inzunza J, et al. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod* 2010; **25**(5): 1271-9.
177. Chirikian O, Feinstein SD, Faynus MA, et al. The effects of xeno-free cryopreservation on the contractile properties of human iPSC derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2022; **168**: 107-14.
178. Ota A, Matsumura K, Lee JJ, Sumi S, Hyon SH. StemCell Keep™ Is Effective for Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells by Vitrification. *Cell Transplant* 2017; **26**(5): 773-87.
179. Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology* 2008; **56**(2): 144-51.
180. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 1994; **58**(4): 755-805.
181. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 1992; **54**: 579-99.
182. Erdag G, Eroglu A, Morgan J, Toner M. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. *Cryobiology* 2002; **44**(3): 218-28.
183. Zhang XB, Li K, Yau KH, et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells. *Transfusion* 2003; **43**(2): 265-72.

184. Wu CF, Tsung HC, Zhang WJ, et al. Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose. *Reprod Biomed Online* 2005; **11**(6): 733-9.
185. Ha SY, Jee BC, Suh CS, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod* 2005; **20**(7): 1779-85.
186. Hayman DM, Blumberg TJ, Scott CC, Athanasiou KA. The effects of isolation on chondrocyte gene expression. *Tissue Eng* 2006; **12**(9): 2573-81.
187. Kino-Oka M, Chowdhury SR, Muneyuki Y, et al. Automating the expansion process of human skeletal muscle myoblasts with suppression of myotube formation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; **15**(4): 717-28.
188. Kanie K, Sakai T, Imai Y, et al. Effect of mechanical vibration stress in cell culture on human induced pluripotent stem cells. *Regenerative therapy* 2019; **12**: 27-35.
189. Chowdhury F, Na S, Li D, et al. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat Mater* 2010; **9**(1): 82-8.
190. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells* 2005; **23**(5): 681-8.
191. Jager LD, Canda CM, Hall CA, et al. Effect of enzymatic and mechanical methods of dissociation on neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. *Adv Med Sci* 2016; **61**(1): 78-84.
192. Liener IE, Goodale RL, Deshmukh A, et al. Effect of a trypsin inhibitor from soybeans (Bowman-Birk) on the secretory activity of the human pancreas. *Gastroenterology* 1988; **94**(2): 419-27.
193. Schneider F, Redmann K, Wistuba J, Schlatt S, Kliesch S, Neuhaus N. Comparison of enzymatic digestion and mechanical dissociation of human testicular tissues. *Fertility and sterility* 2015; **104**(2): 302-11.e3.
194. Zhou L, Nyberg K, Rowat AC. Understanding diffusion theory and Fick's law through food and cooking. *Adv Physiol Educ* 2015; **39**(3): 192-7.
195. Warner RM, Higgins AZ. Mathematical Modeling of Protectant Transport in Tissues. *Methods Mol Biol* 2021; **2180**: 173-88.
196. Santos MV, Sansinena M, Zaritzky N, Chirife J. How important are internal temperature gradients in french straws during freezing of bovine sperm in nitrogen vapor? *Cryo Letters* 2013; **34**(2): 158-65.
197. Ellis BW, Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, et al. Adipose stem cell secretome markedly improves rodent heart and human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte recovery from cardioplegic transport solution exposure. *Stem Cells* 2021; **39**(2): 170-82.
198. Schneider EG, Hayslip CC. Globulin-enriched protein supplements shorten the pre-compaction mitotic interval and promote hatching of murine embryos. *Am J Reprod Immunol* 1996; **36**(2): 101-6.
199. Cordeiro RM, Stirling S, Fahy GM, de Magalhães JP. Insights on cryoprotectant toxicity from gene expression profiling of endothelial cells exposed to ethylene glycol. *Cryobiology* 2015; **71**(3): 405-12.
200. Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology* 2005; **63**(3): 763-73.
201. Osei-Bempong C, Ghareeb A, Lako M, Figueiredo F, Armitage W. Defining the optimal cryoprotectant and concentration for cryopreservation of limbal stem cells *Cryobiology* 2018; **84**: 98-102.
202. Ishida GM, Saito H, Ohta N, et al. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. *Hum Reprod* 1997; **12**(6): 1259-62.
203. Holden KG, Hedrick AR, Gangloff EJ, Hall SJ, Bronikowski AM. Temperature-dependence of metabolism and fuel selection from cells to whole organisms. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol* 2022; **337**(3): 199-205.
204. Bleisinger N, Dittrich R, Strahl O, et al. Me2SO perfusion time for whole-organ cryopreservation can be shortened: Results of micro-computed tomography monitoring during Me2SO perfusion of rat hearts. *PLoS One* 2020; **15**(9): e0238519.
205. Hunt CJ. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods Mol Biol* 2017; **1590**: 41-77.

206. Yang PF, Hua TC, Wu J, Chang ZH, Tsung HC, Cao YL. Cryopreservation of human embryonic stem cells: a protocol by programmed cooling. *Cryo Letters* 2006; **27**(6): 361-8.
207. Xu Y, Zhang L, Xu J, Wei Y, Xu X. Sensitivity of human embryonic stem cells to different conditions during cryopreservation. *Cryobiology* 2015; **71**(3): 486-92.
208. Takeda T, Elsden RP, Seidel GE, Jr. Use of sucrose during removal of cryoprotectants after thawing eight-cell mouse embryos. *Theriogenology* 1987; **28**(1): 101-8.
209. Pan C-y, Yu S, Zhang P-f, et al. Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of Integrative Agriculture* 2017; **16**(5): 1120-9.
210. Uchida T, Furukawa M, Kikawada T, Yamazaki K, Gohara K. Trehalose uptake and dehydration effects on the cryoprotection of CHO-K1 cells expressing TRET1. *Cryobiology* 2019; **90**: 30-40.
211. Plachinta M, Zhang T, Rawson DM. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryo Letters* 2004; **25**(6): 415-24.
212. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 1999; **38**(2): 119-30.
213. Liu JC, Lerou PH, Lahav G. Stem cells: balancing resistance and sensitivity to DNA damage. *Trends Cell Biol* 2014; **24**(5): 268-74.
214. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; **25**(6): 681-6.
215. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; **227**(2): 271-8.
216. Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, et al. Human ovarian tissue preservation: is vitrification acceptable method for assisted reproduction? *Cryo Letters* 2008; **29**(4): 301-14.
217. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, et al. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum Reprod* 2005; **20**(2): 492-6.
218. Uhrig M, Ezquer F, Ezquer M. Improving Cell Recovery: Freezing and Thawing Optimization of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells* 2022; **11**(5).
219. Buján J, Pascual G, García-Honduvilla N, et al. Rapid thawing increases the fragility of the cryopreserved arterial wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; **20**(1): 13-20.
220. Li J, Labbadia J, Morimoto RI. Rethinking HSF1 in Stress, Development, and Organismal Health. *Trends Cell Biol* 2017; **27**(12): 895-905.
221. Byun K, Kim TK, Oh J, et al. Heat shock instructs hESCs to exit from the self-renewal program through negative regulation of OCT4 by SAPK/JNK and HSF1 pathway. *Stem Cell Res* 2013; **11**(3): 1323-34.
222. Baboo J, Kilbride P, Delahaye M, et al. The Impact of Varying Cooling and Thawing Rates on the Quality of Cryopreserved Human Peripheral Blood T Cells. *Scientific Reports* 2019; **9**(1): 3417.
223. Daniel RM, Dines M, Petach HH. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochem J* 1996; **317** ( Pt 1)(Pt 1): 1-11.
224. Tao Q, Li A, Liu X, Ma R, An Y, Shi L. Protecting enzymes against heat inactivation by temperature-sensitive polymer in confined space. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 2011; **13**(36): 16265-71.
225. Ichikawa H, No H, Takei S, et al. Cryopreservation of mouse embryoid bodies. *Cryobiology* 2007; **54**(3): 290-3.
226. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-Anoikis". *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2002; **7**(3): 247-60.
227. Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L, Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol Prog* 2010; **26**(3): 827-37.
228. Sart S, Yan Y, Li Y. The microenvironment of embryoid bodies modulated the commitment to neural lineage postcryopreservation. *Tissue Eng Part C Methods* 2015; **21**(4): 356-66.
229. Sharma S, Szurek EA, Rzucidlo JS, Liour SS, Eroglu A. Cryobanking of embryoid bodies to facilitate basic research and cell-based therapies. *Rejuvenation Res* 2011; **14**(6): 641-9.



230. Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* 2004; **22**(3): 275-82.
231. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface* 2017; **14**(127).
232. Kempf H, Kropp C, Olmer R, Martin U, Zweigerdt R. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Nat Protoc* 2015; **10**(9): 1345-61.
233. Politi MT, Ferreira JC, Patino CM. Nonparametric statistical tests: friend or foe? *J Bras Pneumol* 2021; **47**(4): e20210292.
234. Althouse AD. Adjust for Multiple Comparisons? It's Not That Simple. *Ann Thorac Surg* 2016; **101**(5): 1644-5.
235. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. Wie bewertet man die p-Wert-Flut? Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen – Teil 10 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. *Dtsch Arztebl International* 2010; **107**(4): 50-6.
236. Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Med Res Methodol* 2002; **2**: 8.
237. Albers C. The problem with unadjusted multiple and sequential statistical testing. *Nat Commun* 2019; **10**(1): 1921.
238. Hammad ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 1999; **22**(3): 155-62.
239. Ugarte F, Sousae R, Cinquin B, et al. Progressive Chromatin Condensation and H3K9 Methylation Regulate the Differentiation of Embryonic and Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2015; **5**(5): 728-40.
240. Li X, Meng G, Krawetz R, Liu S, Rancourt DE. The ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survival rate of human embryonic stem cells following cryopreservation. *Stem Cells Dev* 2008; **17**(6): 1079-85.
241. Li X, Krawetz R, Liu S, Meng G, Rancourt DE. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2009; **24**(3): 580-9.
242. Li R, Yu G, Azarin SM, Hubel A. Freezing Responses in DMSO-Based Cryopreservation of Human iPS Cells: Aggregates Versus Single Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2018; **24**(5): 289-99.
243. Divar MR, Azari M, Mogheiseh A, Ghahramani S. Supplementation of melatonin to cooling and freezing extenders improves canine spermatozoa quality measures. *BMC Vet Res* 2022; **18**(1): 86.
244. Liu XC, Sun TC, Li HY, et al. Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved ovarian tissue in mice. *Cryobiology* 2020; **96**: 99-105.
245. Feng TY, Li Q, Ren F, et al. Melatonin Protects Goat Spermatogonial Stem Cells against Oxidative Damage during Cryopreservation by Improving Antioxidant Capacity and Inhibiting Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2020; **2020**: 5954635.
246. Heng BC, Ye CP, Liu H, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *J Biomed Sci* 2006; **13**(3): 433-45.
247. van den Brink L, Brandão KO, Yiangou L, et al. Cryopreservation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes is not detrimental to their molecular and functional properties. *Stem Cell Res* 2020; **43**: 101698.
248. Karimi M, Bahrami S, Mirshekari H, et al. Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering. *Lab Chip* 2016; **16**(14): 2551-71.
249. van Noort D, Ong SM, Zhang C, Zhang S, Arooz T, Yu H. Stem cells in microfluidics. *Biotechnol Prog* 2009; **25**(1): 52-60.
250. Wang X, Yang P. In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. *J Vis Exp* 2008; (17).
251. Sharma A, Rao JS, Han Z, et al. Vitrification and Nanowarming of Kidneys. *Adv Sci (Weinh)* 2021; **8**(19): e2101691.
252. Doll S, Dreßen M, Geyer PE, et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. *Nat Commun* 2017; **8**(1): 1469.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersichtsdarstellung des Aufbaus der Plasmamembran	20
Abbildung 2: Grober Ablauf der Kryokonservierung in diesem Experiment-Design.	24
Abbildung 3: Kryoschäden einer Zelle durch die Kühlrate	26
Abbildung 4: Mazurs Zwei Faktor Hypothese.	27
Abbildung 5: Dropping Methode gemäß dem gynäkologischen Protokoll.	42
Abbildung 6: Gruppeneinteilung der Experimente	55
Abbildung 7: Grober Versuchsplan	59
Abbildung 8: Ablauf der Behandlung der Zellen mit Trypanblau	60
Abbildung 9: Darstellung des Cellometers®	62
Abbildung 10: Darstellung des IceCubes 14S und eines Kryoröhrchens in der Gynäkologie	67
Abbildung 11: Darstellung der mittleren Basis Überlebensrate $S_{\text{basis}}$ der hiPSCs.	78
Abbildung 12: Darstellung der mittleren absoluten Überlebensrate $S_{\text{absolut}}$ der hiPSCs	81
Abbildung 13: Darstellung der mittleren relativen Überlebensrate $S_{\text{relativ}}$ der hiPSCs	85
Abbildung 14: Darstellung der mittleren Wiederfindungsrate der hiPSCs.	89
Abbildung 15: Darstellung der mittleren adaptierten Überlebensrate $S_{\text{adaptiert}}$ der hiPSCs	93
Abbildung 16: Darstellung der mittleren korrigierten Überlebensrate $S_{\text{korrigiert}}$ der hiPSCs	96
Abbildung 17: Darstellung der mittleren Proliferationsrate der hiPSCs.	98
Abbildung 18: Histogramme der Zelldurchmesser der Gruppen A1 und A2	102
Abbildung 19: Histogramme der Zelldurchmesser der Gruppe Trypsinkontrolle.	106
Abbildung 20: Histogramme der Zelldurchmesser der Gruppen B1 und D1	108
Abbildung 21: Q-Q- Diagramm der Durchmesser der Sphäroide zum Zeitpunkt T2.	114
Abbildung 22: Histogramm der Sphäroide zum Zeitpunkt T2.	115
Abbildung 23: Boxplot zu den Durchmessern der Sphäroide zum Zeitpunkt T2.	116
Abbildung 24: Darstellung der Durchmesser der Sphäroide (Gruppe S) in Abhängigkeit der Messzeitpunkte	117
Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.	119
Abbildung 26: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	120
Abbildung 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Sphäroide (Gruppe S)	121

## **7.2. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht der Schritte einer Kryokonservierung sowie entsprechende kritische Variablen	29
Tabelle 2: Vergleich zwischen dem etablierten Protokoll und dem Protokoll aus der Gynäkologie	46
Tabelle 3: Equipment	49
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial	51
Tabelle 5: Zelllinien	51
Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien.	53
Tabelle 7: Puffer, Lösungen und Medium	54
Tabelle 8: Gruppenvergleiche und zugehörige Parameter, die bei der Kryokonservierung untersucht wurden.	57

## 8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Sha Y, Liu W, Li L, Serafimovski M, Isachenko V, Li Y, Chen J, Zhao B, Wang Y, Wei X. Pathogenic Variants in *ACTRT1* Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 676246.

Im Rahmen der Kollaboration mit der AG Reproduktionsmedizin der Uniklinik Köln, geführt von Dr. Volodimir Isachenko, kam es zur Publikation des aufgeführten Artikels. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit waren jedoch kein Bestandteil der Publikation.